

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-1458**
(22) Přihlášeno: **11.05.1998**
(30) Právo přednosti: **13.05.1997 CH 1997/1116**
27.11.1997 CH 1997/2740
(40) Zveřejněno: **16.12.1998**
(Věstník č. 12/1998)
(47) Uděleno: **14.03.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **25.04.2007**
(Věstník č. 17/2007)

(11) Číslo dokumentu:

297 894

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07D 239/70 (2006.01)
C07D 235/02 (2006.01)
C07D 237/06 (2006.01)
C07D 233/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 9745529; EP 0590685; US 4950758.

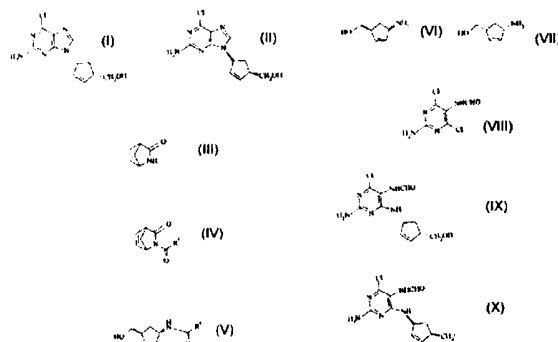
(73) Majitel patentu:
LONZA AG, Visp, CH

(72) Původce:
Bernegger Christine Dr., Münster, CH
Urban Eva Maria, Visp, CH
Birch Olwen Mary Dr., Visp, CH
Burgdorf Kurt, Ried-Brig, CH
Brux Frank, Raron, CH
Etter Kay-Sara, Niedergampel, CH
Bossard Pierre Dr., Onex, CH
Brieden Walter Dr., Brig-Glis, CH
Duc Laurent Dr., Chermignon, CH
Gordon John, Naters, CH
O'Murchu Colm Dr., Visp, CH
Guggisberg Yves Dr., Sierre, CH

(74) Zástupce:
Naděžda Nowaková, Neústupného 1832/22, Praha 5,
15500

(54) Název vynálezu:
Způsob výroby (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu

(57) Anotace:
Způsob výroby (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu vzorců I a II. V prvním stupni acyluje (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on vzorce III na derivát (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu vzorce IV. Ten se ve druhém stupni redukuje na derivát cyklopentenu vzorce V, ten se ve třetím stupni biotechnologicky přemění na (1R,4S)- nebo (1S,4R)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten vzorců VI, VII. Ten se ve čtvrtém stupni převede pomocí N-(2-amino-4,6-dichlor-pyrimidin)-5-yl)formamidu vzorce VIII na (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-[(2-amino-6-chlor-5-formamido-4-pyrimidinyl)-amino]-2-cyklo-penten-1-methanol vzorců IX, X a posleďně jmenovaná sloučenina se v pátém stupni cyklizuje na konečný produkt vzorce I nebo II.



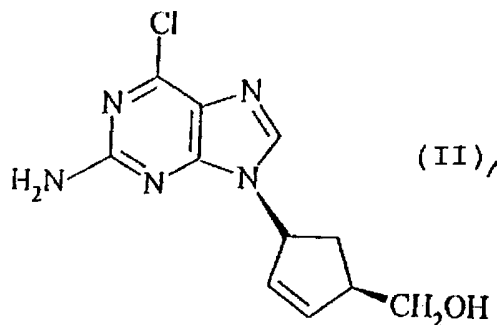
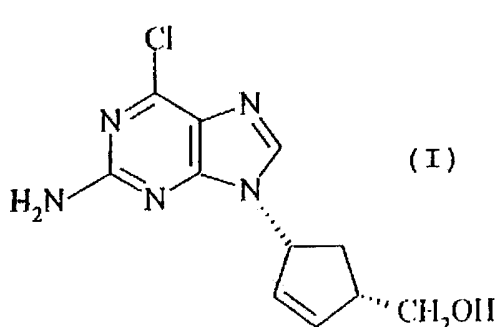
CZ 297894 B6

Způsob výroby (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu

Oblast techniky

5

Vynález se týká nového způsobu výroby (1S,4R)-nebo (1R,4S)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu vzorců I a II



10

(1S,4R)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanol-je důležitý mezi-produkt pro výrobu 2-aminopurinnukleosidů, jako například pro výrobu (1S,4R)-4-[2-amino-6-(cyklopropylamino)-9-H-purin-9-yl]-2-cyklopenten-1-methanolu (WO 95/21 161) nebo pro výrobu 1592U89 (J. Org. Chem., 1996, 61, 4192-4193; J. Org. Chem., 1996, 61, 7963-7966).

Dosavadní stav techniky

15

Způsob výroby (1S,4R)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu z (1S,4R)-4-amino-2-cyklopenten-1-methanolu je popsán ve WO 95/21 161. Nevýhodou tohoto způsobu je to, že lze edukt (1S,4R)-4-amino-2-cyklopenten-1-methanol získat výhradně přes (±)-2-azobicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on substituovaný drahou BOC-chránicí skupinou (terc.-butyloxykarbonylová chránicí skupina) (J. Org. Chem. 1995, 60, 4602-4616).

20

Úkolem vynálezu bylo poskytnout jednoduchý, výhodný a hospodárnější způsob výroby (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu.

25

Podstata vynálezu

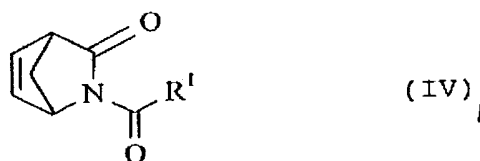
Tato úloha se vyřešila způsobem podle vynálezu.

30

První stupeň způsobu podle vynálezu se provádí tak, že se acyluje (±)-2-azobicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on obecného vzorce III



za vzniku derivátu (±)-2-azobicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu obecného vzorce IV



kde R¹ znamená C₁₋₄-alkyl, C₁₋₄-alkoxy, aryl nebo aryloxy.

C₁₋₄-alkyl může být substituovaný nebo nesubstituovaný. Pod pojmem substituovaný C₁₋₄-alkyl se v následujícím rozumí C₁₋₄-alkyl substituovaný atom halogenu. Jako atom halogenu lze použít F, Cl, Br nebo J. Jako příklady pro C₁₋₄-alky jsou methyl, ethyl, propyl, butyl, izobutyl, 5
terc-butyl, izopropyl, chlormethyl, brommethyl, dichlormethyl, dibrommethyl. Výhodně se jako C₁₋₄-alkyl používá methyl, ethyl, propyl, butyl, izobutyl nebo chlormethyl.

Jako C₁₋₄-alkoxy lze například použít methoxy, ethoxy, propoxy, butoxy, terc-butoxy nebo izobutoxy. Výhodně se jako C₁₋₄-alkoxy používá terc-butoxy.

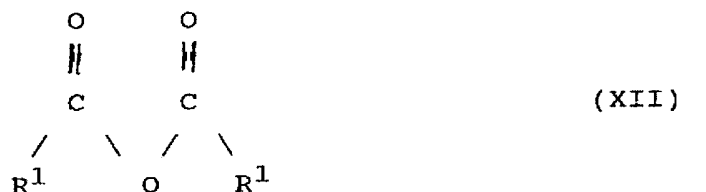
Jako aryl se může například použít fenyl nebo benzyl, výhodně fenyl. Jako aryloxy se může například použít benzyloxy nebo fenoxi.

Edukt (±)-2-azobicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on lze vyrobit podle EP-A-0 508 352.

15 Acylaci lze uskutečnit halogenidem karboxylové kyseliny obecného vzorce XI



nebo anhydridem karboxylové kyseliny obecného vzorce XII



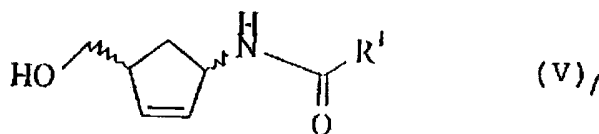
20 kde R¹ má uvedený význam a X znamená atom halogenu. Jako atom halogenu X se mohou použít F, Cl, Br nebo J. Výhodně se používá Cl nebo F.

Příklady pro halogenidy karboxylových kyselin jsou: acetylchlorid, chloracetylchlorid, chlorid kyseliny máselné, chlorid kyseliny izomáselné, chlorid kyseliny fenylactové, benzylester, kyseliny chlormravenčí (Cbz-Cl), chlorid kyseliny propionové, benzoylchlorid, allylester kyseliny chlormravenčí nebo terc-butyloxykarbonylfluorid. Příklady pro anhydridy karboxylových kyselin jsou: terc-butoxykarbonylanhydrid, anhydrid kyseliny máselné, anhydrid kyseliny octové nebo anhydrid kyseliny propionové.

30 Acylaci lze provést bez rozpouštědla nebo s aprotickým rozpouštědlem. Účelně se acylace provádí v aprotickém rozpouštědle. Jako aprotické rozpouštědlo jsou vhodné například diizopropylether, pyridin, acetonitril, dimethylformamid, triethylamin, tetrahydrofuran, toluen, methylenchlorid, N-methylpyrrolidon, popřípadě jejich směsi.

35 Účelně se acylace provádí při teplotě od -80 až 50 °C, výhodně od 0 do 25 °C.

Ve druhém stupni způsobu podle vynálezu se redukuje derivát (±)-2-azobicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu obecného vzorce IV na derivát cyklopentenu obecného vzorce V



40 kde R¹ má uvedený význam.

Redukce se účelně provádí borhydridem alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy, aluminiumhydridem alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy nebo vitridem (natrium-bis-(2-methoxyethoxy)aluminiumhydrid). Jako aluminiumhydrid alkalického kovu lze použít natrium-
 5 nebo kaliumaluminiumhydrid. Jako borhydrid alkalického kovu lze použít natrium- nebo kaliumborhydrid. Jako borhydrid kovu alkalické zeminy použít kalciumborhydrid. Jako nitrid lze například použít nitrid hlinitý.

Účelně se redukce provádí v protickém rozpouštědle. Jako protické rozpouštědlo se mohou
 10 použít nízké alifatické alkoholy jako je methanol, ethanol, propanol, izopropanol, butanol, sek-butanol, terc-butanol, izo-butanol nebo voda, popřípadě směs jmenovaných alkoholů a vody.

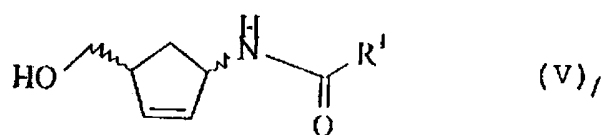
Redukce se účelně provádí při teplotě od -40 do 40 $^{\circ}\text{C}$, výhodně od 0 do 20 $^{\circ}\text{C}$.

Třetí stupeň způsob podle vynálezu, přeměna derivátu cyklopentenu obecného vzorce V na
 15 (1R,4S)- nebo (1S,4R)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten vzorců VI a VII



se provádí buď pomocí mikroorganismů, enzymu s N-acetylaminoalkoholhydrolasovou aktivitou
 20 nebo pomocí acylas penicilinu G. Při této biotransformaci se přeměňuje acylovaný derivát (1S,4R) nebo (1R,4S)-aminoalkoholu, přičemž vznikne (1R,4S)- nebo (1S,4R)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten (vzorce VI, VII).

Pro biotransformaci jsou vhodné všechny mikroorganismy, které zužitkují derivát cyklopentenu
 25 obecného vzorce V jako jediný zdroj dusíku, jako jediný zdroj uhlíku nebo jako jediný zdroj uhlíku a dusíku. Mikroorganismy lze izolovat ze vzorků půdy, kalu nebo odpadních vody za pomoci obvyklých mikrobiologických technik. Izolace mikroorganismů se uskutečňuje tak, že se pěstují obvyklým způsobem v živném médiu, které obsahuje derivát cyklopentenu obecného vzorce V



kde R^1 má uvedený význam,

- jako jediný zdroj uhlíku a dusíku
- jako jediný zdroj dusíku s vhodným zdrojem uhlíku nebo
- 35 - jako jediný zdroj uhlíku s vhodným zdrojem dusíku.

Jako deriváty cyklopentenu obecného vzorce V jsou vhodné například: N-acetyl-, N-propionyl-,
 40 N-izobutyryl, N-terc.butoxykarbonyl-(N-BOC), N-butyryl nebo N-fenylacetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten.

Jako vhodný zdroj dusíku mohou mikroorganismy jako růstový substrát využívat amonium,
 45 nitráty, aminokyseliny nebo močoviny. Jako vhodné zdroje uhlíku mohou mikroorganismy využívat jako růstový substrát například cukr, cukerné alkoholy, C_2 - C_4 -karboxylové kyseliny nebo aminokyseliny. Jako cukr se mohou použít hexózy jako glukóza nebo pentózy. Jako cukerný alkohol lze například použít glycerin. Jako C_2 - C_4 -karboxylové kyseliny lze například

použít kyselinu octovou nebo propionovou. Jako aminokyseliny lze například použít leucin, alanin, asparagin.

Jako selekční a růstové médium se mohou použít v oboru běžně užívaná média, jako například médium uvedené v tabulce 1 nebo „plné médium“ (médium obsahující extrakt kvasnic) jako například „Nutrient Yeast Broth“ (NYB), výhodně médium uvedené v tabulce 1.

Při pěstování a selekci se účelně indikují účinné enzymy mikroorganismů. Jako eduktor enzymů se mohou použít deriváty cyklopentenu obecného vzorce V.

Obvykle se uskutečňuje pěstování a selekce při teplotě od 20 do 40 °C, výhodně do 30 do 38 °C a hodnotě pH mezi 5,5 a 8, výhodně mezi pH 6,8 a pH 7,8.

Účelně se provádí biotransformace s mikroorganismy, které zužitkují (1R,4S)-izomery derivátu cyklopentenu jako jediný zdroj uhlíku, jako jediný zdroj uhlíku a dusíku nebo jako jediný zdroj dusíku.

Výhodně se biotransformace provádí pomocí mikroorganismů rodu *Alcaligenes/Bordetella*, *Rhodococcus*, *Arthobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium/Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* nebo *Gordona*, zejména druhu *Alcaligenes/Bordetella* FB 188 (DSM 11172), *Rhodococcus erythropolis* CB 101 (DSM 10686), *Arthobacter* sp. HSZ5 (DSM 10328), *Rhodococcus* sp. FB 387 (DSM 11291), *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *denitrificans* HSZ17 (DSM 10329), *Agrobacterium/Rhizobium* HSZ30, *Bacillus simplex* K2, *Pseudomonas putida* K32 nebo *Gordona* sp. CB 100 (DSM 10687), jakož i s jejich funkčně ekvivalentními variantami a mutanty. Mikroorganismy DSM 10686 a 10687 byly uloženy 20.05.1996, mikroorganismy DSM 10328 a DSM 10329 byly uloženy 06.11.1995, mikroorganismus DSM 11291 08.10.1996 a mikroorganismus DSM 11172 20.09.1996 u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur GmbH, Mescheroderweg 1b, D38124 Braunschweig, podle Budapešťské úmluvy.

Pod výrazem „funkčně ekvivalentní varianty a mutanty“ se rozumějí mikroorganismy, které mají v podstatě stejné vlastnosti a funkce jako původní mikroorganismy. Takové varianty a mutanty mohou vzniknout náhodně, například UV-ozářením.

Taxonomický popis *Alcaligenes/Bordetella* FB 188 (DSM 11172)

35	buněčná forma	tyčinky
	šířka μm	0,5–0,6
	délka μm	1,0–2,5
40	pohyblivost	+
	mrskání	peritrich
	Gram-reakce	–
	lyze 3%ním KOH	+
	aminopeptidáza (Cerny)	+
45	spóry	–
	oxidáza	+
	kataláza	+
	ADH (alkoholdehydrogenáza)	–
50	NO ₂ z NO ₃	–
	denitrifikace	–
	ureáza	–
	hydrolýza želatiny	–
	kyselina z (OF-test):	
55	glukózy	–

	fruktózy	—
	arabinózy	—
	adipátu	+
	kaprátu	+
5	citrátu	+
	malátu	+
	mannitolu	—

Taxonomický popis *Rhodococcus erythropolis* CB 101 (DSM 106 86)

10

1. Morfologie a barvy kolonií: krátké rozvětvené hyfy, které se ve stáří rozpadají na tyčinky a koky, kolonie jsou lesklé částečně roztekuté, béžový s růžovým tónem, RAL 1001.

15

2. Diagnostikovaná aminokyselina peptidoglykanu: kyselina meso-diaminopimelinová.

20

3. Kyseliny mykolové: kyseliny mykolové mikroorganismu *Rhodococcus*; určení délky řetězce kyseliny mykolové (C₃₂–C₄₄) a srovnání údaje s údaji zanesenými do databanky DSM–kyselin mykolových ukázalo ve velmi vysokou podobnost se vzorky kmenů *Rhodococcus erythropolis* (podobnost 0,588).

25

4. Vzorek mastných kyselin: nerozvětvené, nenasycené a nenasycené mastné kyseliny plus kyseliny tuberkulostearinové.

5. Při parciálním sekvencování 16S rDNA kmenu byla zjištěna vysoká schopnost (100%) se sekvencemi specifických oblastí *Rhodococcus erythropolis*.

Výsledek identifikace je jednoznačný, neboť tři na sobě nezávislé metody (kyseliny mykolové, mastné kyseliny, 16S rDNA) přiřadily kmen druhu *Rhodococcus erythropolis*.

30

Taxonomický popis *Gordona* sp. CB 100 (DSM 10687)

1. Morfologie a barva kolonie: krátké rozvětvené hyfy, které se ve stáří rozpadají na tyčinky a koky, kolonie jsou světle oranžové, (RAL 2008).

35

2. Diagnostikovaná aminokyselina peptidoglykanu: kyselina meso-diaminopimelinová.

3. Vzorek menachinonu: MK-9(H₂) 100%.

40

4. Kyseliny mykolové: kyseliny mykolové mikroorganismu *Gordona*; určení délky řetězce kyseliny mykolové (C₅₀–C₆₀) se uskutečnilo pomocí vysokoteplotní plynové chromatografie. Tento vzorek odpovídá vzorku, jaký se nalézá u zástupců rodu *Gordona*.

45

5. Vzorek mastných kyselin: nerozvětvené, nasycené a nenasycené mastné kyseliny plus kyselina tuberkulostearinová.

6. Při parciálním sekvencování 16S rDNA kmenu byla zjištěna relativně nízká shodnost (98,8%) se sekvencemi specifických oblastí *Gordona rubropertincta*.

50

Na základě předložených výsledků (menachinovy, kyseliny mykolové, mastné kyseliny, 16S rDNA), lze izolát sice jednoznačně přiřadit rodu *Gordona*. Přiřazení ke známému druhu *Gordona* není možné na základě těchto výsledků. Je tedy třeba předpokládat, že se u kmenu DSM 10687 jedná o nový dosud nepopsaný druh rodu *Gordona*.

Taxonomický popis *Alcaligenes cylosoxydans* ssp. *denitroficans* HSZ 17 (DSM 10329)

55

Vlastnosti kmene

5	buněčná forma	tyčinky
	šířka μm	0,5–0,6
	délka μm	1,5–3,0
	pohyblivost	+
	mrskání	peritrich
10	Gram–reakce	–
	lyze 3%ním KOH	+
	aminopeptidáza (Cerny)	+
	spóry	–
15	oxidáza	+
	kataláza	+
	růst anaerobně	–
	ADH (alkoholdehydrogenáza)	+
	NO_2 z NO_3	+
20	denitrifikace	+
	ureáza	–
	hydrolyza	
	želatina	–
25	Tween 80	–
	kyselina z (OF–test):	
	glukózy aerobně	–
	xylózy 80	–
30	zužitkování substrátu	
	glukózy	–
	fruktózy	–
	arabinózy	–
35	citrátu	+
	malátu	+
	mannitolu	–
40	Taxonomický popis Arthobacter sp. HSZ5 (DSM 10328)	
	charakteristika:	Gram–pozitivní nepravidelné tyčinky s výrazným růstovým cyklem tyčinky–koky; striktně aerobní; žádná tvorba kyseliny nebo plynu z glukózy
45	pohyblivost	–
	spóry	–
	kataláza	+
	<i>meso</i> –diaminopimelinová kyselina v buněčné stěně: ne	
50	peptidoglykanový typ:	A3 α , L–Lys–L–Ser–L–Thr–L–Ala
	podobnost sekvence 16S rDNA:	sekvencování oblasti s největší variabilitou prokázalo jako nejvyšší hodnoty 98,2 % s <i>Arthrobacter pascens</i> , <i>A. ramosus</i> a <i>A. oxydans</i>
55		

Taxonomický popis *Agrobacterium/Rhizobium* HSZ30

	buněčná forma	pleomorfní tyčinky
	šířka μm	0,6–1,0
5	délka μm	1,5–3,0
	Gram–reakce	–
	lyze 3 %ním KOH	+
	aminopeptidáza	+
10	spóry	–
	oxidáza	+
	kataláza	+
	pohyblivost	+
	růst anaerobně	–
15	nitrit z nitrátu	–
	denitrifikace	–
	ureáza	+
	hydrolyza želatiny	–
20	kyselina z:	
	L–arabinózy	+
	galaktózy	–
	melezitózy	–
	fukózy	+
25	arabitolu	–
	mannitolu	–
	erythritolu	–
	alkalizace lakmusového mléka:	+
30	ketolaktóza	–

35 Parciální sekvencování 16S rDNA prokázalo srovnatelně velké ca 96 % podobnosti k zástupcům rodů *Agrobacterium* a *Rhizobium*. Jednoznačné přiřazení k jednomu druhu popsanému v rámci těchto rodů není možné.

Taxonomický popis *Bacillus simplex* K2

	buněčná forma	tyčinky
40	šířka μm	0,8–1,0
	délka μm	3,0–5,0
	spóry	–
	elipsoidní	–
45	kulaté	–
	sporangium	–
	kataláza	+
	anaerobní růst	–
50	VP reakce	k.W.
	maximální teplota	
	pozitivní růst při °C	40
	negativní růst při °C	45
55		

	růst v	
	médiu pH 5,7	—
	NaCl 2 %	+
	5 %	—
5	7 %	—
	10 %	—
	médiu s lysozymem	+
	kyselina z (ASS)	
10	D–glukózy	+
	L–arabinózy	+
	D–xylózy	—
	D–mannitu	+
	D–fruktózy	+
15	plyn z fruktózy	—
	lecithináza	—
20	hydrolyza	
	škrobu	+
	želatiny	+
	kaseinu	—
	Tween 80	+
25	eskulinu	—
	zužitkování	
	citrátu	+
	propionátu	—
30	nitril z nitrátu	+
	indol	—
35	fenylalanindesamináza	—
	arginindihydroláza	—
	Analýza buněčných mastných kyselin potvrdila přiřazení k rodu <i>Bacillus</i> .	
40	Parciální sekvenování 16S rDNA prokázala 100 % podobnost k <i>Bacillus simplex</i> .	
	Taxonomický popis <i>Pseudomonas putida</i> K32	
	buněčná forma	tyčinky
45	šířka μm	0,8–0,9
	délka μm	1,5–4,0
	pohyblivost	+
	mrskání	polární > 1
50	Gram–reakce	—
	lyze 3%ním KOH	+
	aminopeptidáza	+
	spóry	—
55	oxidáza	+

	kataláza	+
	růst anaerobně	—
5	pigmenty fluoreskující pyocyanin	+ —
	ADH	+
10	nitrit z nitrátu	—
	denitrifikace	—
	ureáza	—
15	hydrolýza želatiny	—
	zužitkování substrátu	
	adipát	—
	citrát	+
20	malát	+
	D-mandalát	+
	fenylacetát	+
	D-tartrát	—
	D-glukóza	+
25	trehalóza	—
	mannitol	—
	benzoylformiát	—
	propylenglykol	+
	butylamin	+
30	benzylamin	+
	tryptamin	—
	acetamid	+
	hippurát	+
35	Profil buněčných mastných kyselin je typický pro <i>Pseudomonas putida</i> . Parciální sekvenování 16S rDNA prokázala ca 98 % podobnost k <i>Pseudomonas mendocina</i> a <i>Pseudomonas alcaligenes</i> . Podobnost k <i>Pseudomonas putida</i> byla 97,4 %.	
40	Taxonomický popis <i>Rhodococcus</i> sp. FB 387 (DSM 11291)	
	1. Morfologie a barva kolonií: krátké rozvětvení hyfy, které se ve stáří rozpadají na tyčinky a koky, kolonie jsou matné, světle červenooranžové RAL 2008.	
45	2. Diagnostikovaná aminokyselina peptidoglykanu: kyselina meso-diaminopimelinová.	
	3. Kyseliny mykolové: kyseliny mykolové mikroorganismu <i>Rhodococcus</i> . Určení délky řetězce kyseliny mykolové (C ₃₂ –C ₄₄) a srovnání údajů se záznamy DSMZ–databanky mykolových kyselin prokázalo jen velmi malou podobnost ke vzorkům kmenů <i>Rhodococcus ruber</i> (podobnost, 0,019). Tento korelační faktor je příliš malý na to, aby mohl být 50 použit pro identifikaci druhu.	
	4. Vzorek mastných kyselin: nerozvětvené, nasycené a nenasycené mastné kyseliny plus kyselina tuberkulostearinová.	

Tento vzorek mastných kyselin je diagnostický pro všechny zástupce rodu *Rhodococcus* a jejich blízké příbuzné jako *Mycobacterium*, *Nocardia* a *Gordona*. Byl učiněn pokus o diferenciaci druhu při zohlednění kvalitativních a kvantitativních rozdílů ve vzorku mastných kyselin. Pomocí numerických metod se vzorek mastných kyselin. Pomocí numerických metod se vzorek mastných kyselin z *Rhodococcus* sp. FB 387 srovnal se záznamy databanky. Také pomocí této metody se nemohl *Rhodococcus* sp. FB 387 z důvodu malé podobnosti (0,063) přiřadit k žádnému popsanému druhu *Rhodococcus*.

5. Při parciálním sekvencování 16S rDNA kmenu bylo přiřazeno 96–818 s 97,9 % korelací *Rhodococcus opacus*. Tato shodnost sekvence je hodně pod 99,5 %, jak se požaduje pro jednoznačné přiřazení k druhu v tomto taxonu.

Na základě předložených výsledků je možné vycházet z toho, že se u kmene *Rhodococcus* sp. FB 387 jedná o nový dosud nepopsaný druh.

Biotransformace se může provádět po obvyklém pěstování těchto mikroorganismů s buňkami v klidu (nerostoucí buňky, které již nepotřebují žádný zdroj uhlíku a energie) nebo s rostoucími buňkami. Výhodně se biotransformace provádí s buňkami v klidu.

Enzymy s N-acetylaminoalkoholhydrolasovou aktivitou vhodné pro biotransformaci lze například izolovat v oboru běžným způsobem otevřením popsaných buněk mikroorganismů. K tomu se může například použít metody s ultrazvukem nebo Frenschovu tlakovou metodu. Výhodně se tyto enzymy izolují z mikroorganismů *Rhodococcus erythropolis* CB101 (DSM 10686).

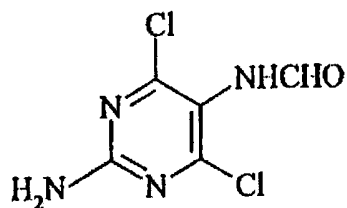
Vhodné acylázy penicilinu G se získají z mnoha mikroorganismů, například z bakterií nebo aktinomycetenů, zvláště z následujících mikroorganismů: *Escherichia coli* ATCC 9637, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces lavendulae* ATCC 13664, *Nocardia* sp. ATCC 13635, *Providencia rettgeri* ATCC 9918, *Arthrobacter viscosus* ATCC 15294, *Rhodococcus fascians* ATCC 12975, *Streptomyces phaeochromogenes* ATCC 21289, *Achromobacter* ATCC 23584 a *Micrococcus roseus* ATCC 416. Zejména se používají obchodně dostupné acylázy penicillinu G jako acyláza EC 3.5.11 penicilinu G z *E. coli* (Boehringer Mannheim) nebo z *Bacillus megaterium*. Ve výhodném provedení se používají imobilizované acylázy penicilinu G.

Biotransformace se může provádět v médiích známých v oboru, jako například v nízkomolekulárních fosfátových, citrátových nebo Hepes-pufrech, ve vodě, v úplných médiích jako například „Nutrient Yeast Broth“ (NYB) nebo v médiích popsaných v tabulce 1. Výhodně se biotransformace provádí v médiu uvedeném v tabulce 1 nebo nízkomolekulárním fosfátovém pufru.

Účelně se biotransformace provádí za jednorázového nebo kontinuálního přidávání derivátu cyklopentenu (vzorec V) tak, že koncentrace nepřesáhne 10 % hmotn., výhodně 2 % hmotn.

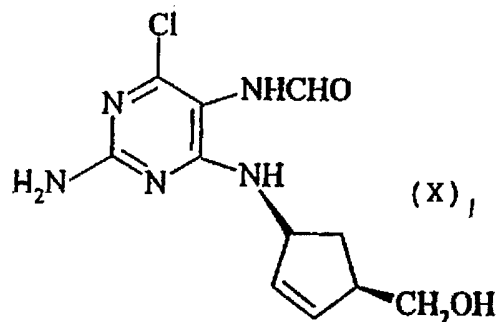
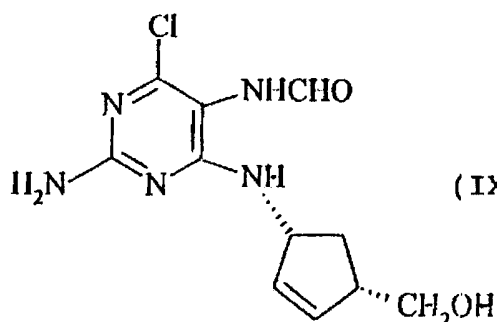
Hodnota pH během biotransformace může být v rozmezí od 5 do 9, výhodně od 6 do 8. Účelně se biotransformace provádí při teplotě od 20 do 40 °C, výhodně od 25 do 30 °C.

Ve čtvrtém stupni se derivát cyklopentenu (vzorec VI nebo VII) s N-(2-amino-4,6-dichlorpyrimidin)-5-yl)formamidem vzorce VIII



(VIII) I

převeďte na (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-[(2-amino-6-chlor-5-formamido-4-pyrimidinyl)-amino]-2-cyklopenten-1-methanol vzorce IX nebo X



N-(2-amino-4,6-dichlorpyrimidin)-5-yl)formamid se může vyrobit podle WO 95/21 161.

Účelně se reakce ve čtvrtém stupni provádí v přítomnosti báze. Jako báze se mohou použít organické báze nebo anorganické báze. Jako organické báze se mohou použít trialkylaminy. Příklady trialkylaminů jsou triethylamin, tributylamin, tribenzylamin, pyridin nebo N-methylpyrrolidin. Jako anorganické báze se mohou použít například uhličitany alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, popřípadě hydrogenuhličitany alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin jako například uhličitán draselný nebo hydrogenuhličitán sodný.

Účelně se reakce ve čtvrtém stupni provádí v protickém rozpouštědle. Jako protické rozpouštědlo lze použít nízké alifatické alkoholy jako methanol, ethanol, propanol, izopropanol, butanol nebo izobutanol.

Účelně se reakce ve čtvrtém stupni provádí při teplotě od 0 do 150 °C, výhodně od 20 do 100 °C.

V pátém stupni se (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-[(2-amino-6-chlor-5-formamido-4-pyrimidinyl)-amino]-2-cyklopenten-1-methanol (vzorec IX, X) cyklizuje známým způsobem podle WO 95/21 161 na konečný produkt vzorce I nebo II.

Obvykle se cyklizace provádí při rozpouštění v trialkylortho v formátech v přítomnosti koncentrované vodné kyseliny. Jako trialkylorthoformáty se mohou například použít trimethyl- nebo triethylorthoformát. Jako vodná kyselina se může například použít kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina methansulfonová.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Výroba (±)-2-acetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu

100 g (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v acetonitrilu (800 ml) a pyridinu (161,26 ml). Při 12 °C se přikapalo 104,5 g acetylchloridu po dobu 2 hodin. Směs se ještě míchala 4,5 hodiny při teplotě místnosti. K směsi se přidalo 800 ml vody a acetonitril se odpařil za vakua. Vodná fáze se 3krát extrahovala 400 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze se ještě promyly 1N HCl (400 ml), vodou (400 ml), nasyceným NaCl (400 ml), sušily s síranem hořečnatým a zcela odpařily. Ke zbytku se přidal methylenchlorid a to se filtrovalo přes křemičitanový gel. Filtrát se zahustil a produkt se čistil destilací. Získalo se 107,76 g produktu jako čirá kapalina. Výtěžek představoval 71 %.

Kp 9,33 Pa: 51 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm]
400 MHz

2,25 (AB syst., 2H);
2,8 (s, 3H);
3,42 (m, 1H);
5,30 (m, 1H);
6,89 (m, 1H);
6,92 (m, 1H).

10 Příklad 2

Výroba (±)-2-butyryl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu

103 g (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v acetonitrilu (720 ml) a pyridinu (142 ml). Při 12 °C se přikapalo 141,8 g chloridu kyseliny máselné po dobu 1 hodiny. Reakce se ještě míchala 3 hodiny při teplotě místnosti. Ke směsi se přidalo 720 ml vody a fáze se oddělily. Acetonitril se odpařil za vakua a vodní fáze se 3krát extrahovala ethylacetátem (300 ml). Spojené organické fáze se ještě promyly 1N HCl (350 ml), nasyceným NaCl (400 ml) a vodou (500 ml), sušily se síranem hořečnatým a úplně odpařily. Produkt se čistil destilací. Získalo se 107,76 g produktu jako čirá kapalina. Výtěžek představoval 85 %.

Kp 6,66 Pa: 70 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm]
400 MHz

0,98 (t, J = 8,5 Hz, 3H);
1,58–1,65 (2H);
2,23 (AB syst., 2H);
2,82–2,90 (2H);
3,42 (m, 1H);
5,30 (m, 1H);
6,62 (m, 1H);
6,92 (m, 1H).

Příklad 3

Výroba (±)-2-fenylacetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu

33,4 g (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v acetonitrilu (240 ml) a pyridinu (48,3 ml). Při 12 °C se přikapalo 68,6 g chloridu kyseliny fenyloctové po dobu 30 minut. Směs se ještě míchala 3,5 hodiny při teplotě místnosti. Ke směsi se přidalo 240 ml vody. Acetonitril se odpařil za vakua a vodní fáze se 3krát extrahovala ethylacetátem (150 ml). Spojené organické fáze se ještě promyly 1N HCl (150 ml), nasyceným NaCl (150 ml) a vodou (150 ml), sušily se síranem hořečnatým a úplně odpařily. Surový produkt se filtroval přes křemičitanový gel (hexan:ethylacetát=1:1). Získalo se 78,34 g surového produktu jako žlutý olej.

45 Příklad 4

Výroba (±)-2-propionyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu

47 g (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v acetonitrilu (325 ml) a pyridinu (41 ml). Při 12 °C se přikapalo 43,9 g chloridu kyseliny propionové po dobu 1 hodiny. Reakce se ještě míchala 5 hodin při teplotě místnosti. Ke směsi se přidalo 145 ml vody a acetonitril se odpařil za vakua. Vodná fáze se 3krát extrahovala 115 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze se ještě promyly 1N HCl (140 ml), nasycenými roztoky NaHCO₃ (40 ml) a NaCl (40 ml), sušily se síranem sodným a úplně odpařily. Zbytek se čistil destilací. Získalo se 55,8 g titulní sloučeniny, která stáním ztuhla. Výtěžek byl 81,6 %.

Kp 280 Pa 75 až 80 °C

t.t.: 54 až 56 °C

5	¹ H-NMR (CDCl ₃): δ [ppm] 400 MHz	0,95 (t, 3H); 2,10 (quad., 1H); 2,28 (quad., 1H); 2,64 (m, 2H); 3,42 (s, 1H); 5,16 (m, 1H); 6,78 (m, 1H); 6,96 (m, 1H).
10		

Příklad 5

15 Výroba (±)-2-izobutyryl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu

45,1 g (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v acetonitrilu (310 ml) a pyridinu (39 ml). Při 10 °C se přikapalo 54,1 g chloridu kyseliny izomásečné po dobu 1 hodiny. Reakce se ještě míchala 5 hodin při teplotě místnosti. Ke směsi se přidalo 140 ml vody a acetonitril se odpařil za vakua. Vodná fáze se 4krát extrahovala 120 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze se ještě promyly 1H HCl (50 ml), nasycenými roztoky NaHCO₃ (50 ml) a NaCl (50 ml), sušily se síranem sodným a úplně odpařily. Zbytek se vařil v n-hexanu (240 ml) s aktivním uhlím za zpětného toku. Po filtraci aktivního uhlí se filtrát ochladil při 0 °C a titulní sloučenina filtrovala. Získalo se 54,5 g produktu. Výtěžek byl 76 %.

25 t.t.: 41 až 42 °C

30	¹ H-NMR (CDCl ₃): δ [ppm] 400 MHz	0,92 (d, 3H); 1,06 (d, 3H); 2,10 (m, 1H); 2,28 (m, 1H); 3,40 (m, 2H); 5,16 (s, 1H); 6,78 (m, 1H); 7,92 (m, 1H).
----	---	--

35

Příklad 6

Výroba (±)-2-chloracetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu

10,1 g (±)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem a při 10 °C ve směsi dichlormethanu (10 ml), pyridinu (8,4 ml) a 0,22 g 4-N,N-dimethylaminopyridinu. Přikapalo se 13,5 g chloracetylchloridu po dobu 1 hodiny. Teplota stoupla až na 44 °C. Směs se dále míchala 2 hodiny při teplotě místnosti. Ke směsi se přidalo 100 ml vody. Po oddělení fází se vodná fáze extrahovala 100 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze se sušily se síranem sodným a úplně odpařily. Zbytek se vařil ve 100 ml diizopropyletheru za zpětného toku v přítomnosti 1 g aktivního uhlí po dobu 10 minut. Po horké filtraci se filtrát ochladil na teplotu místnosti, pevná látka se filtrovala a sušila. Získalo se 10,35 g titulní sloučeniny. Výtěžek byl 60 %.

45 t.t.: 86 až 88 °C

50	¹ H-NMR (CDCl ₃): δ [ppm] 400 MHz	2,28 (d, 1H); 2,40 (d, 1H); 3,48 (s, 1H); 4,56 (d, 2H); 5,30 (s, 1H);
----	---	---

6,70 (d, 1H);

6,94 (m, 1H).

5 Příklad 7

Výroba (±)-N-acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

79,56 g (±)-2-acetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v ethanolu (450 ml) a ochladilo na -10 °C. Po částech se po dobu 45 minut přidávalo 19,8 g natriumborhydridu.

Reakce se ještě míchala 3 hodiny při teplotě 0 °C a pak se upravilo pH na 1,8 pomocí koncentrované kyseliny sírové. Ke směsi se pak přidal ethylacetát (200 ml) a pevné látky se odfiltrovaly. Pak se to úplně odpařilo. Ke zbytku se přidala voda, promylo se methylenchloridem a odpařilo.

15 Surový produkt se ještě čistil filtrací s křemičitanovým gelem. Získalo se 51,83 g produktu jako bílá pevná látka. Výtěžek byl 64 % vztaženo na vnesený 2-acetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm]
400 MHz

20 1,18 (m, 1H);
1,78 (s, 3H);
2,29 (m, 1H);
2,66 (m, 1H);
3,35 (s, 2H);
4,58 (s, 1H);
4,72 (m, 1H);
25 5,61 (d, 1H);
5,85 (d, 1H);
7,83 (d, 1H).

30 Příklad 8

Výroba (±)-N-butyryl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

73,87 g (±)-2-butyryl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v ethanolu (400 ml) a ochladilo na -10 °C. Po částech se po dobu 45 minut přidávalo 15,68 g natriumborhydridu. Reakce se ještě míchala 3 hodiny při teplotě 0 °C a pak se upravilo pH na 1,5 pomocí koncentrované kyseliny sírové. Ke směsi se přidal ethylacetát (200 ml) a pevné látky se odfiltrovaly. Pak se to úplně odpařilo. Ke zbytku se přidala voda, promyl se methylenchloridem, odpařil a sušil za vysokého vakua. Získalo se 60,55 g produktu. Výtěžek byl 80 % vztaženo na vnesený (±)-2-butyryl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on.

40 t.t.: 71 až 72 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm]
400 MHz

45 0,98 (t, J=8,5 Hz, 3H);
1,40–1,50 (1H);
1,58–1,68 (2H);
2,10–2,18 (2H);
2,42–2,55 (1H);
3,62 (AB syst., 2H);
4,98 (m, 1H);
5,78–5,82 (2H);
6,38 (m, 1H).

50

Příklad 9

Výroba (±)-N-fenylacetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

77 g surového ($\pm$)-2-fenylacetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem v ethanolu (450 ml) a ochladilo na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po částech se po dobu 1 hodiny přidávalo 13,2 g natriumborhydridu. Reakce se ještě míchala 3,5 hodin při teplotě místnosti a pak se upravilo pH na 1,8 pomocí koncentrované kyseliny sírové. Tato směs se čistila filtrací s křemičitanovým gelem (hexan:ethylacetát=2:8). Po překrystalování z ethylacetátu se získalo 15,89 g bílé pevné látky. Výtěžek byl 80 % vztaženo na vnesený ($\pm$)-2-fenylacetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on.

	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]	1,28–1,35 (1H);
10	400 MHz	1,40 (m, 1H);
		2,38–2,45 (1H);
		2,79 (m, 1H);
		3,50 (AB syst., 2H);
		3,52 (s, 3H);
15		4,98 (m, 1H);
		5,75 (m, 2H);
		5,98 (m, 1H);
		7,20–7,38 (5H).

20

Příklad 10

Výroba ($\pm$)-N-BOC-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu (BOC=terc-butoxykarbonyl)

25 15 g surového hydrochloridu ($\pm$)-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu (vyrobeného podle J.Org. Chem. 1981, 46, 3268) se rozpustilo pod dusíkem při pokojové teplotě ve směsi 150 ml vody a 150 ml dioxanu. Roztok se upravil 1N NaOH na hodnotu pH 14, pak se přidal roztok terc.butyloxykarbonylfluoridu (BOC-F, 20 % přebytek) v diethyletheru a při teplotě místnosti ještě 3 hodiny dále míchal (BOC-F připravený podle Synthesis 1975, 599). Hodnota pH se upravila koncentrovanou HCl na 2. Po destilaci organických rozpouštědel se ke zbytku přidalo 30 50 ml vody a směs se 3krát extrahovala 100 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze se úplně odpařily. Zbytek se krystalizoval ve směsi 110 ml diizopropyletheru a 80 ml n-hexanu. Získalo se 11,95 g titulní sloučeniny. Výtěžek představoval 56 %.

t.t.: 68 až $70\text{ }^{\circ}\text{C}$

35	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]	1,18 (m, 1H);
	400 MHz	1,38 (s, 9H);
		2,26 (m, 1H);
		2,65 (m, 1H);
		3,33 (t, 2H);
40		4,45 (m, 1H);
		4,55 (m, 1H);
		5,62 (m, 1H);
		5,79 (m, 1H);
		6,73 (d, 1H).

45

Příklad 11

Výroba ($\pm$)-N-propionyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

50 16,6 g ($\pm$)-2-propionyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem ve vodě (140 ml) a 2-butanolu (66 ml) a ochladilo na $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po částech se po dobu 2 hodin přidávaly 3 g natriumborhydridu. Směs se ještě míchala 2,5 hodiny při teplotě $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pak se upravil pH na 2,2 pomocí směsi koncentrované kyseliny chlorovodíkové a vody (1/1). Roztok se odpařil na 40 g a

pH se upravilo na hodnotu 6,2 s 2N NaOH. Směs se extrahovala 5krát 50 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze se úplně odpařily a zbytek se překrystalizoval z toluenu (150 ml). Získalo se 11,1 g titulní sloučeniny. Výtěžek byl 65 %.

t.t.: 67 až 68 °C.

5	¹ H-NMR (CDCl ₃): δ [ppm] 400 MHz	0,96 (t, 3H); 1,16 (quint., 1H); 2,04 (quad., 2H); 2,26 (m, 1H); 2,66 (m, 1H);
10		3,34 (m, 2H); 4,58 (t, 1H); 4,72 (m, 1H); 5,61 (m, 1H); 5,84 (m, 1H);
15		7,72 (d, 1H).

Příklad 12

Výroba (±)-N-izobutyryl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

- 20 9 g (±)-2-izobutyryl-2-azebicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se rozpustilo pod dusíkem ve vodě (32 ml) a 2-butanolu (84 ml) a ochladilo na 0 °C. Po částech se po dobu 3,5 hodiny přidávalo 1,37 g natriumborhydridu. Směs se dále míchala 3 hodiny při teplotě 20 °C, pak se upravilo pH na 2,5 pomocí směsi koncentrované kyseliny chlorovodíkové a vody (1/1) a pak se neutralizovalo
- 25 2N NaOH. Směs se odpařila na 40 g. Zbytek se extrahoval 3krát 80 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze se úplně odpařily. Získaná pevná látka krystalizovala v 25ml toluenu. Získalo se 6,8 g titulní sloučeniny. Výtěžek byl 73,6 %.

t.t. 80 až 81 °C

30	¹ H-NMR (CDCl ₃): δ [ppm] 400 MHz	0,98 (d, 6H); 1,16 (quint., 1H); 2,30 (m, 2H); 2,68 (m, 1H); 3,32 (t, 2H); 4,58 (t, 1H);
35		4,70 (m, 1H); 5,61 (m, 1H); 5,82 (m, 1H); 7,68 (d, 1H).

40

Příklad 13

Výroba (1R,4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu pomocí acyláz penicilinu G

- 45 Pro biotransformaci se použila acyláza EC 3.5.1.11 penicilinu G z E. coli (Bohring Mannheim) 165 U (jednotek)/g nebo acyláza EC 3.5.1.11 penicilinu G z Bacillus megaterium. K tomu se inkubovalo 50 mM pufru fosforečnanu sodného (pH 5–9; 4 ml) s 1 % hmotn. neracemického N-fenylacetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu a 400 mg odpovídající acylázy penicilinu G při 37 °C.

- 50 Po určitých časových intervalech se odebíraly vzorce a analyzovaly pomocí tenkovrstevné chromatografie (křemičitanový gel 60, butanol:voda:ledová kys. octová=3:1:1; detekce ninhydrinem), plynové chromatografie (kapilární sloupec, HP-5,5 % fenylmethylsiloxanu) nebo pomocí HPLC.

Enzym odštěpil s vysokou aktivitou fenacetylovou skupinu a uvolnil až 40 % odpovídajícího aminoalkoholu. Volný aminoalkohol se získal s ee-hodnotou 80 %.

5 Příklad 14

Výroba (1R,4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu pomocí mikroorganismů

14.1 Kal (20 %) z čističky ARA ve Visp se inkuboval v A+N médiu (viz tabulka 1), které obsahovalo 0,5 % hmotn. N-acetyl-, N-propionyl-, N-izobutyryl-, nebo N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu, při 37 °C za třepání. Tvorba (1R,4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu se sledovala pomocí tenkovrstevné chromatografie.

1 % těchto obohacených vzorků se 1–3x přeočkovalo a jednotlivě nanaslo na pevné média (Plate Count Agar v médiu z tabulky 1; 20 g/l). Tímto způsobem se izolovaly mikroorganismy *Alcaligenes/Bodetella* FB 188 (DSM 1172), *Rhodococcus erythropolis* CB 101 (DSM 10686), *Gordona* sp. CB 100 (DSM 10687) a *Rhodococcus* sp. FB 387 (DSM 11291).

14.2 Takto izolované mikroorganismy se pěstovaly v médiu (tabulka 1), které obsahovalo 0,5 % N-acetyl-, N-propionyl-, N-izobutyryl-, nebo N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu. Rostly 24 až 36 hodin až k optické hustotě (OD) od 2 do 3. Takto získané buňky se sebraly v pozdně exponenciální růstové fázi a promyly v 10 mM fosfátovém pufru.

Následující biotransformace se provedla v 50 mM fosfátovém pufru (pH 4,5–9), který obsahoval 1 % hmotn. N-acetyl-, N-izobutyryl-, nebo N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten. Tenkovrstevnou chromatografií se zjistilo, že 50 % substrátu bylo hydrolyzováno na (1R, 4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten. HPLC analýzy udaly ee-hodnoty mezi 80 a 93 %.

Jestliže se jako substrát použil N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten, byla biotransformace 0,14 (g/l/h/OD) pro kmen DSM 10686, když se pěstovalo na A+N médiu 0,03 (g/l/h/OD), když se pěstovalo na NYB („Nutrient Yeast Broth“) médiu, které obsahovalo N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten.

Jestliže se provedla stejná přeměna s kmenem DSM 10687 při koncentraci substrátu (N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten) 200 mM, byla biotransformace 0,161 (g/l/h/OD).

Tabulka 1 médium A + N

40	MgCl ₂	0,4 g/l
	CaCl ₂	0,014 g/l
	FeCl ₃	0,8 mg/l
	Na ₂ SO ₄	0,1 g/l
	KH ₂ PO ₄	1 g/l
45	Na ₂ HPO ₄	2,5 g/l
	NaCl	3 g/l
	roztok vitamínů	1 ml/l
	roztok stopových prvků	1 ml/l
	pH 7,5	

50

14.3. *Rhodococcus erythropolis* DSM 10686 se pěstoval v 6 l fermentoru v minimálním médiu (srovnej tabulku 2) s octanem amonným (3 g/l) jako zdroj uhlíku, popřípadě dusíku při 30 °C do buněčné hustoty od 650>25. Během buněčného růstu se kontinuálně přidávala 50 % kyselina octová jako dodatečný zdroj uhlíku. Pro indukování enzymové aktivity se pak přidalo 60 g (+/-)-N-acetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu a inkubovalo několik hodin.

55

Nakonec se ještě jednou přidalo 40 g ($\pm$)-N-acetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu a pak dalších deset hodin inkubovalo. Průběh biotransformace se sledoval on-line pomocí HPLC. Při dosažení 40 % analytického výtěžku, vztaženo na vnesený racemický substrát, a ee-hodnoty 85 % se fermentace ukončila přidáním kyseliny:

Tabulka 2

složení média

10	Komponenty	Koncentrace
	extrakt kvasnic	0,5 g/l
	pepton M66	0,5 g/l
	KH ₂ PO ₄	4,0 g/l
15	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,5 g/l
	K ₂ SO ₄	2,0 g/l
	NH ₄ -acetát	3,0 g/l
	CaCl ₂	0,2 g/l
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,0 g/l
20	roztok stopových prvků (viz dole)	1,5 ml/l
	PPG (polypropylenglykol)	0,1 g/l
	Roztok stopových prvků	
	KOH	15,1 g/l
25	EDTA.Na ₂ · 2H ₂ O	100,0 g/l
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	9,0 g/l
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	4,0 g/l
	H ₃ BO ₃	2,7 g/l
	COCl ₂ · 6H ₂ O	1,8 g/l
30	CuCl ₂ · 2H ₂ O	1,5 g/l
	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,18 g/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,27 g/l

14.4 Podobně jako v příkladu 14.3 se pěstovaly mikroorganismy *Arthobacter* sp. HSZ 5 (DSM 10328), *Rhodococcus* sp. FB 387 (DSM 11291), *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *denitrificans* HSZ 17 (DSN 1329), *Agrobacterium/Rhizobium* HSZ 30, *Bacillus simplex* K2 a *Pseudomonas putida* K32 na octanu sodném v médiu (tabulka 1) se sloučeninami a bez sloučenin N-acetyl-, N-propionyl-, N-izobutyryl nebo N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten, v dalším zkráceně označené jako aminoalkoholy.

Následující výsledky se dosáhly s exponenciálním buňkami, které se pěstovaly bez aminoalkoholů (analyzováno HPLC):

45	Kmen	Poměr v procentech [nMol/OD.h]	Hodnota ee/přeměna [%]
	HSZ 5 (DSM 10328)	0,05	88,7/16
	HSZ 17 (DSM 10329)	0,005	95/23
	K32	0,05	54/1
50	CB101 (DSm 10686)	0,1	84/39

Kmeny K2 a K17 se pěstovaly, sebraly a podrobily se 60-hodinové biotransformaci.

	Kmen	Poměr v procentech [nMol/OD.h]	Hodnota ee/přeměna [%]
	K2	–	92/10
5	HSZ 30	–	93/3,5

Ze všech násad se sebraly exponenciální a stacionární buňky a použily se po biotransformaci jako buňky v klidu. Na základě DC-analýzy se nepozoroval žádný rozdíl v počátečním poměru u buněk indukovaných nebo neindukovaných aminoalkoholem.

10

Příklad 15

Čištění N-acetylaminolhydrolázy z *Rhodococcus erythropolis* CB101 (DSm 10686)

15 Enzym byl čištěn jak je dále uvedeno až byl pozorován už jen jeden svazek proteinů v SDS-PAGE (Pharmacia Phast Gel, 10–15 % gradient) při molekulové hmotnosti 50 kD.

20 Buňky *Rhodococcus erythropolis* CB101 (DSM 10686) se promyly v 50 mM Tris-pufu (pH 6,2) a koncentrovaly na optickou hustotu 190 při OD_{650nm}. Po přidání fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF) na konečnou koncentraci 1 mM a DNázy se buňky podrobily Frenchovu lisu (tlakové zařízení), aby se získal surový extrakt. Po odstředění se získalo 200 ml bezbuněčného extraktu s koncentrací proteinů 4,8 mg ml⁻¹.

25 960 mg bezbuněčného extraktu se nanoslo na iontoměničový chromatografický sloupec HiLoad 26/10 Q-Sepharose (Pharmacia), který byl ekvilibrován 50 mM Tris-pufem (pH 8,0), který obsahoval 1 mM dithiothreitolu (DTT).

30 Po promytí sloupce stejným pufem byly proteiny eluovány lineárním gradientem pufru (1500 ml; gradient: 50 mM Tris-pufr (pH 8,0), obsahující 1 mM DTT– 50mM Tris-Pufr (pH 7,0), obsahující 1 mM DTT a 1 M NaCl). Enzym se eluoval ze sloupce mezi 370 a 430 mM NaCl a při pH 7,6. Aktivní frakce se sbíraly a zahustily na 9 ml. Obsah proteinů byl 41 mg.

35 Pro další čištění se roztok proteinů nanosil na gelově filtrační chromatografický sloupec HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia), který byl ekvilibrován 50 mM Tris-pufem, který obsahoval 50 mM NaCl a 1 mM DTT. Aktivní frakce se spojily a měly společný obsah proteinů 10,9 mg.

40 Tento proteinový roztok se nanosil na sloupec Mono Q HR5/5 (Pharmacia), který byl ekvilibrován 50 mM Tris-pufem (pH 8,5) obsahujícím 1 mM DDT. Proteiny byly eluovány lineárním gradientem (40 ml) 50 mM Tris-pufr (pH 8,5), obsahující 1 mM DTT – 50 mM Tris-pufr (pH 8,5), obsahující 1 mM DTt a 1 m NaCl. Enzym se eluoval mezi 390 mM NaCl a 440 mM NaCl. Aktivní frakce obsahovaly 1,4 mg proteinu.

45 V posledním čisticím kroku se použil stejný sloupec ekvilibrovaný stejným pufem. Jako eluční gradient sloužil stejný pufr s 0–500 NaCl a pH 7,0–8,5. Tímto způsobem se dalo izolovat 430 µg čistého enzymu.

50 N-koncová sekvence enzymu se určila přímo z „Protein-Blot“. Získala se sekvence 20 následujících aminokyselin: Thr–Glu–Gln–Asn–Leu–His–Trp–Leu–Ser–Ala–Thr–Glu–Met–Ala–Ala–Ser–Val–Ala–Ser–Asn.

Tato sekvence není homologní ke známým proteinům.

Příklad 16

Charakterizace enzymu

Charakterizace enzymu se prováděla jak s čištěným enzymem, tak také s bezbuněčným extraktem, který byl odsolen pomocí sloupce Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia).

Koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu byla $7,3 \text{ mg ml}^{-1}$ a koncentrace proteinů v čištěném enzymu byla $135 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. PMSF se k bezbuněčnému extraktu nepřidával.

16.1 Určení K_m

Určení K_m se provedlo v bezbuněčném extraktu. Hodnota K_m reakce byla při pH 7,0 a při teplotě 30°C $22,5 \text{ mM}$ pro substrát N-acetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopten.

16.2 pH optimum

pH optimum pro hydrolýzu N-acetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu (25 mM) se určovalo s čištěným enzymem a v bezbuněčném extraktu v rozsahu pH od 6,2 – 9,0 v následujících roztocích pufru.

Tris-pufr 100 mM pH 9,0; 8,5; 8,0; 7,5; 7,0
citrát-fosfátový pufr 100 mM pH 7,0; 6,55; 6,2

Aktivita se měřila 24 hodin.

pH optimum reakce bylo mezi pH 7,0 a 7,5 pro produkci 1R,4S a 1S,4R enantiomeru.

U bezbuněčného extraktu bylo pH optimum aktivity při pH 7,0. Selektivita byla však lepší mezi pH 6,0 a pH 7,0

Obr. 1 znázorňuje aktivitu A-acetylaminoalkoholhydrolázy (bzbuněčný extrakt) z Rhodococcus erythropolis CB 101 (DSM 10686) v závislosti na hodnotě pH.

16.3 Teplotní optimum pro reakci uvedenou v příkladu 16.2 leželo mezi 25°C a 30°C .

Obr. 2 znázorňuje aktivitu A-acetylaminoalkoholhydrolázy (bzbuněčný extrakt) z Rhodococcus erythropolis CB 101 (DSM 10686) v závislosti na teplotě.

16.4 Molekulové hmotnost byla určena podle SDS-PAGE na 50 kD .

16.5 Jako substráty byly hydrolyzovány: N-acetyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten, N-butyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten, N-propionyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten, N-izobutyryl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten, N-izobutyl-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopenten.

Příklad 17

Výroba hydrochloridu (1R,4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

$374,1 \text{ g}$ roztoku (1R,4S)-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu (obdobná výroba jako v příkladu 14) se odpařilo na $123,7 \text{ g}$. Roztok obsahoval $60,2 \text{ mMol}$ hořejší sloučeniny (HPLC) a pH se upravilo 30%ním NaOH z hodnoty 2 na 11,7, pak se extrahoval 3x 70 ml izobutanolu. Spojené izobutanolové extrakty se plynným HCl upravily na pH 1, zahustily na 65 g a filtrovaly (odstranění pevných nečistot). K filtrátu se při 20°C a při dobrém míchání přikapalo 60 ml

acetonu. Kalná směs se naočkovala krystaly titulní sloučeniny a míchala 1 hod. při 5 °C. Po filtraci a sušení se získalo 5,2 g produktu. Výtěžek byl 58 %.

t.t.: 125 až 127 °C.

ee-hodnota 98 % (cejchovaný chirální HPLC-sloupec)

5	¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ [ppm]	1,44 (m, 1H);
	400 MHz	2,35 (m, 1H);
		2,83 (m, 1H);
		3,42 (m, 2H);
		4,10 (s, 1H);
10		4,80 (s, 1H);
		5,80 (d, 1H);
		6,06 (d, 1H);
		8,13 (s, 3H).

15

Příklad 18

Výroba (1R,4S)-N-BOC-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

pH 75 g roztoku (1R,4S)-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu (obdobná výroba jako v příkladu 14; 44,6 mMol sloučenin) se upravilo 30%ním NaOH na hodnotu 8 a k roztoku se přidalo 6 g NaHCO₃. Směs se zahřála na 52 °C. Za dobrého míchání se k tomu přidalo 60 ml diizopropyletheru a pak během 2 hod. přidával roztok 11,12 g BOC-anhydridu v 18,2 ml diizopropyletheru. Směs se filtrovala přes Celite a fáze se oddělily. Vodná fáze se extrahovala 65 ml diizopropyletheru. Spojené organické fáze se promyly 45 ml vody, pak se odpařily na 37,5 g a zahřály na 50 °C. K roztoku se přikapalo 31 ml n-hexanu. Po pomalém ochlazení na 0 °C (2 hod.) se titulní sloučenina filtrovala, promyla 12 ml n-hexan/diizopropylether 1/1 a sušila. Získalo se 6,75 g produktu. Výtěžek byl 71 %.

25

t.t.: 70 až 71 °C

30 ee-hodnota 98 % (cejchovaný chirální HPLC-sloupec)

	¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ [ppm]	1,18 (m, 1H),
	400 MHz	1,27 (s, 9H),
		2,28 (m, 1H),
		2,63 (m, 1H);
35		3,33 (q, 2H);
		4,43 (m, 1H);
		4,56 (t, 1H);
		5,62 (m, 1H);
		5,78 (m, 1H);
40		6,72 (d, 1H).

Příklad 19

Výroba hydrochloridu (1R,4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

45

87,8 g (1R,4S)-N-BOC-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu se rozpustilo ve 270 ml 2N HCl a 1340 ml methanolu. Směs se při zpětném toku vařila 4,5 hodiny. Po destilaci methanolu se zbytek rozpustil v 800 ml vody. Vodný roztok se 2x extrahovala 340 ml ethylacetátu. Vodná fáze se úplně odpařila (50 °C/6 kPa). Pevná látka se sušila ve vakuu při 50 °C, suspendovala 150 ml diethyletheru, filtrovala a 2x promyla 50 ml diethyletheru. Po sušení se získala titulní sloučenina s 95 % výtěžkem (58,4 g).

50

Fyzikální a spektroskopická data produktu byla stejná jako v příkladu 17.

Příklad 20

5 Výroba (1R,4S)-N-acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

25 g hydrochloridu (1R,4S)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu se rozpustilo v 182 ml anhydridu kyseliny octové a při 0 °C se přidal roztok 18,25 g triethylaminu v 60 ml anhydridu kyseliny octové. Směs se míchala 3 hodiny při 80 °C, pak se ochladila na teplotu
10 místnosti. Triethylaminhydrochlorid se odfiltroval a promyl 120 ml n-hexanu. Filtrát se odpařil. Ke zbytku se přidalo 300 ml toluenu a při teplotě místnosti v přítomnosti 5,2 g aktivního uhlí a 13 g Celitu se 20 minut míchalo. Po filtraci a promytí filtračního koláče (3x 40 ml toluenu) se rozpouštědlo úplně zahustilo. Ke zbytku se přidalo 180 ml methanolu a 15,5 g K₂CO₃ a míchalo
15 se 10 hodin při pokojové teplotě. Suspenze se filtrovala a filtrát se odpařil. Zbytek se suspendoval v 750 ml izopropylacetátu a vařilo se 1,5 hodiny při zpětném toku v přítomnosti 0,5 g aktivního uhlí. Po filtrování aktivního uhlí (70 až 80 °C) se filtrát přes noc chladil na 0 °C. Titulní sloučenina se filtrovala, promyla 80 ml studeného izopropylacetátu a sušila za vakua. Získalo se 17,2 g produktu. Výtěžek byl 66 %.

20 t.t.: 77 až 80 °C

ee-hodnota 98 % (cejchovaný chirální HPLC-sloupec)

¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ [ppm]	1,15 (m, 1H);
400 MHz	1,78 (s, 3H);
	2,25 (m, 1H);
25	2,66 (m, 1H);
	3,35 (m, 2H);
	4,58 (t, 1H);
	4,70 (m, 1H);
	5,62 (m, 1H);
30	5,85 (m, 1H);
	7,80 (d, 1H).

Příklad 21

35 Výroba (1S,4R)-N-acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

Z 25 g výchozího hydrochloridu (1S,4R)-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu se způsobem podle příkladu 18 vyrobil titulní enantiomer (výtěžek 68 %). Fyzikální a spektroskopická data produktu byla stejná jako v příkladu 20.

40

Příklad 22

45 Výroba (1R,4S)-1-[(2-amino-6-chlor-5-formamidopyrimidin-4-yl)amino]-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

2,07 g N-(2-amino-4,6-dichlorpyrimidin-5-yl)formamidu se zahřálo na 80 °C ve 40 ml izobutanolu (bílá suspenze). Ke směsi se přidal roztok 1,97 g hydrochloridu (1R,4S)-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu, 3,8 triethylaminu a 15 ml izobutanolu. Směs se 13 hodin při 80 °C dále míchala. K čirému roztoku se při 20 °C přidalo 10 ml 1N NaOH a odpařilo se až do sucha. Zbytek se podrobil „flash“-chromatografii (sloupec křemičitanového gelu 60, délka 8 cm, průměr 6,5 cm, eluční činidlo ethylacetát/methanol 95/5). Po odpaření elučního činidla a sušení zbytku se získalo 2,1 g titulní sloučeniny. Výtěžek byl 74 %.

50

t.t.: 174 až 176 °C

ee-hodnota 98 % (cejchovaný chirální HPLC-sloupec)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm]
400 MHz

5

10

1,37 (m, 1H);
2,35 (m, 1H);
2,73 (m, 1H);
3,38 (t, 2H);
4,68 (m, 1H);
5,08 (m, 1H);
5,70 (d, 1H);
5,85 (d, 1H);
6,40; 6,55; a 6,65 (s, d, a d, spolu 3H);
7,78 a 8,10 (d a s, spolu 1H);
8,85 a 8,95 (d a s, spolu 1H).

15

Příklad 23

Výroba (1R,4S)-1-[(2-amino-6-chlor-5-formamidopyrimidin-4-yl)amino]-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopentenu

20

25

145,2 ml roztoku (1R,4S)-1-amino-4-hydroxymethyl-2-cyklopentenu (obdobná výroba jako v příkladu 14) se zahustilo na 25,5 ml a zfiltrovalo přes Celit. Filtrační koláč se promyl 7,5 ml vody. Filtrát obsahoval 17,7 mMol hořejší sloučeniny (HPLC) a koncentrovanou HCl se upravilo pH z 6,6 a 1, pak se 3x extrahoval 20 ml izobutanolu. Organická fáze se odstranila. pH vodné fáze se upravilo 30% NaOH na hodnotu 12 a vodná fáze se 3x extrahovala 10 ml izobutanolu. Spojené organické fáze se zahustily na 15 ml a přidaly se 2,53 g triethylaminu. Ke směsi se přidal, jako v příkladu 24 roztok 2,07 g N-(2-amino-4,6-dichlorpyrimidin-5-yl)formamidu ve 40 ml ethanolu. Směs se míchala 16 hodin při 80 °C. Po zpracování jako v příkladu 22 se získalo 2,4 g titulní sloučeniny. Výtěžek byl 85 %.

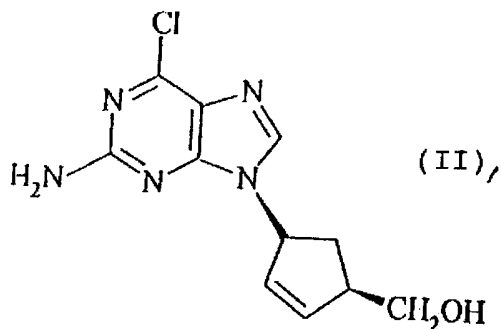
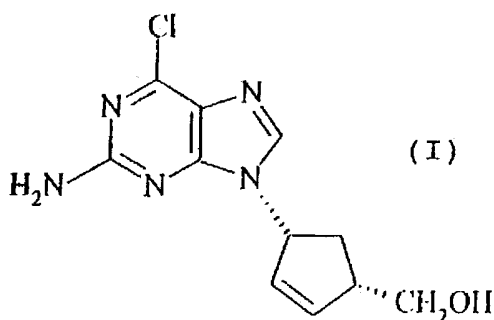
30

Fyzikální a spektroskopická data produktu byla stejná jako v příkladu 22.

PATENTOVÉ NÁROKY

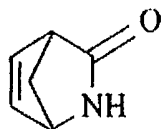
35

1. Způsob výroby (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-(2-amino-6-chlor-9-H-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolu nebo jeho soli vzorců I, II



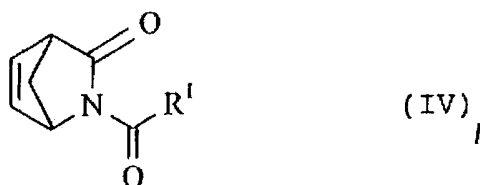
40

vyznačující se tím, že se v prvním stupni acyluje ($\pm$)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on vzorce III

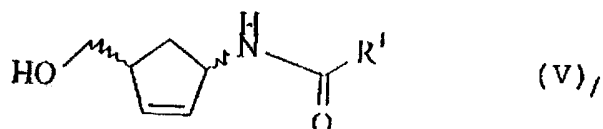


(III),

na derivát $(\pm)$ -2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu obecného vzorce IV



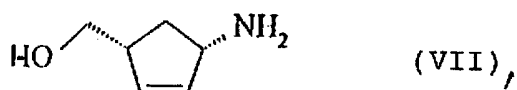
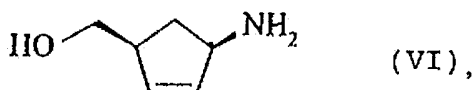
kde R¹ znamená C₁₋₄-alkyl, C₁₋₄-alkoxy, aryl nebo aryloxy, ten se ve druhém stupni redukuje a derivát cyklopentenu obecného vzorce V



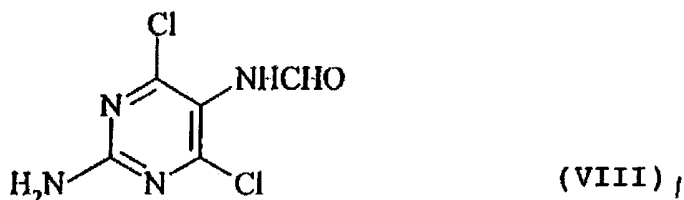
5

kde R¹ má výše uvedený význam, ten se ve třetím stupni přemění buď pomocí mikroorganismu, který je schopen zužitkovat derivát cyklopentenu obecného vzorce V jako jediný zdroj dusíku, jako jediný zdroj uhlíku, nebo jako jediný zdroj uhlíku a dusíku, pomocí enzymu s N-acetyl-aminoalkoholhydrolasovou aktivitou nebo pomocí acylasy penicilinu G na (1R,4S)- nebo (1S,4R)-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten vzorců VI, VII

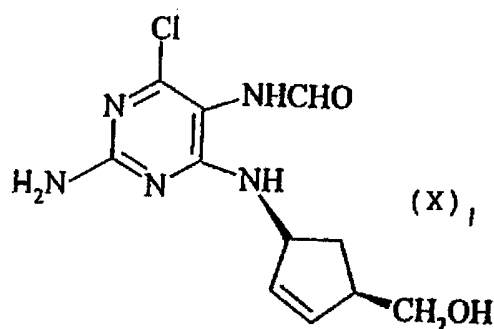
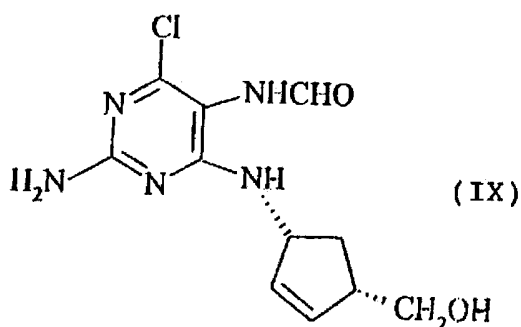
10



ten se ve čtvrtém stupni převede pomocí N-(2-amino-4,6-dichlorpyrimidin-5-yl)formamidu vzorce VIII



15 na (1S,4R)- nebo (1R,4S)-4-[(2-amino-6-chlor-5-formamido-4-pyrimidinyl)-amino]-2-cyklopenten-1-methanol vzorců IX, X



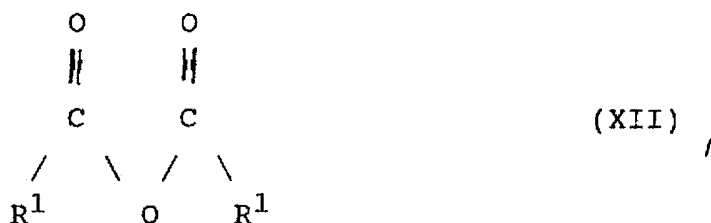
a posleďně jmenovaná sloučenina se v pátém stupni cyklizuje známým způsobem na konečný produkt vzorce I nebo II.

20

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se acylace v prvním stupni provádí s halogenidem karboxylové kyseliny obecného vzorce XI



kde R^1 má výše uvedený význam a X znamená atom halogenu, nebo s anhydridem karboxylové kyseliny obecného vzorce XII

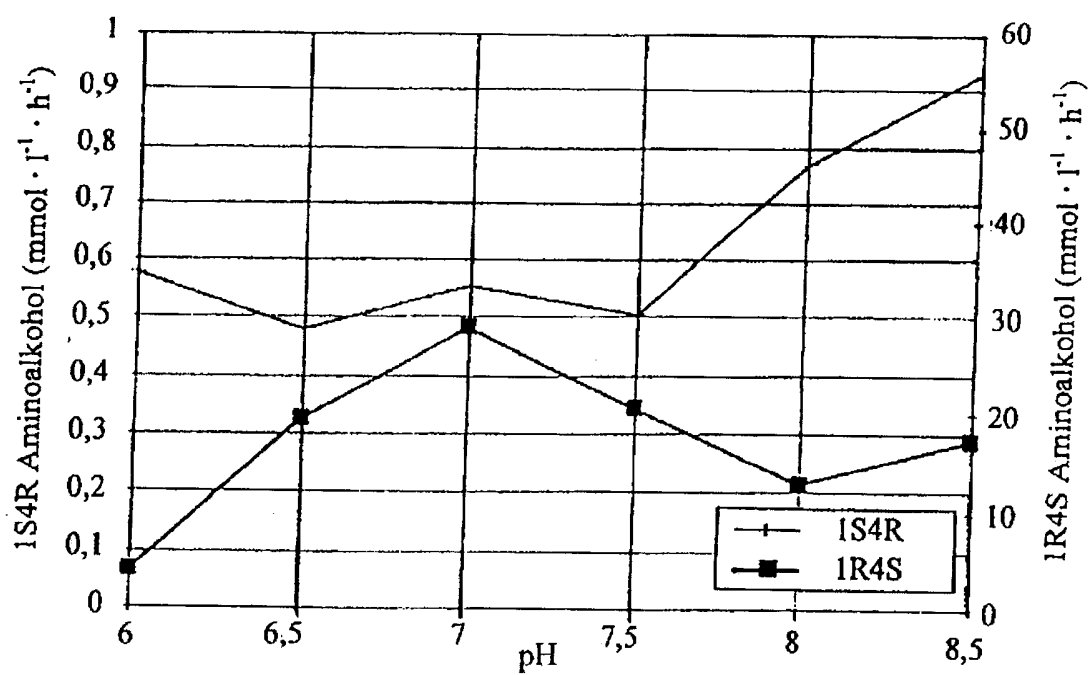


5 kde R^1 má výše uvedený význam.

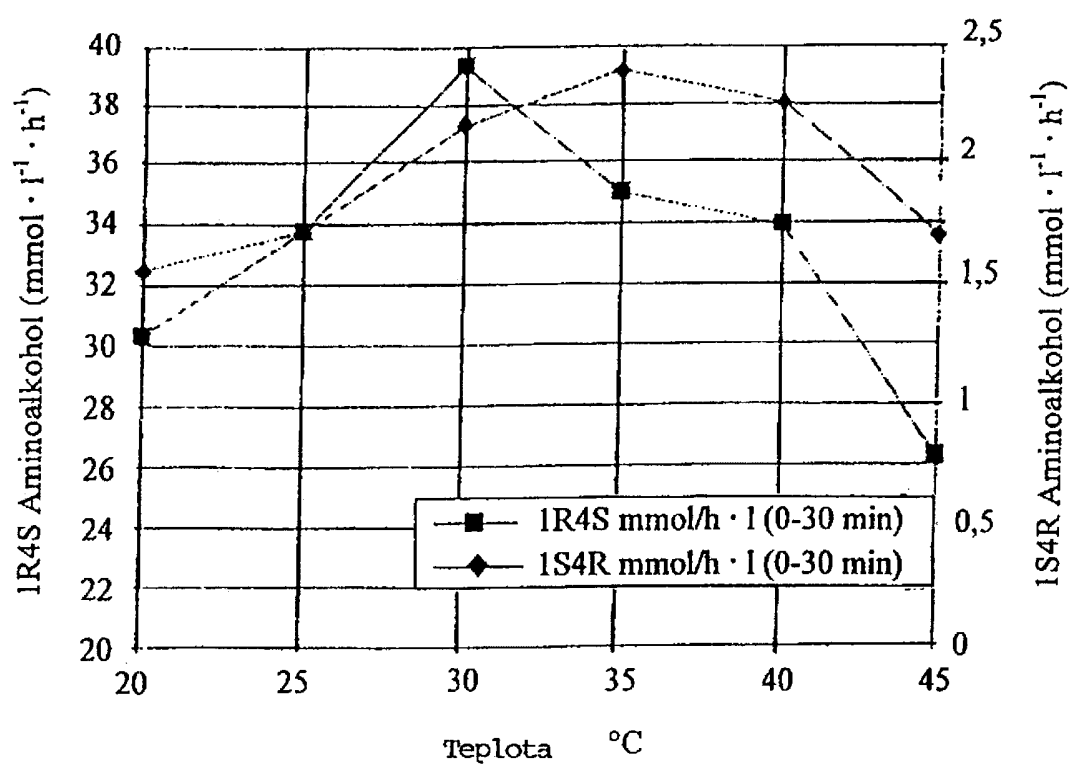
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se acylace v prvním stupni provádí v aprotickém rozpouštědle.
- 10 4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se redukce ve druhém stupni provádí borhydridem alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy, aluminiumhydridem alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy nebo vitridem.
- 15 5. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že se redukce ve druhém stupni provádí v protickém rozpouštědle.
- 20 6. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že se přeměna ve třetím stupni provádí pomocí mikroorganismů rodu Rhodococcus, Gordona, Arthrobacter, Alcaligenes, Agrobacterium/Rhizobium, Bacillus, Pseudomonas nebo Alcaligenes/Bordetella.
- 25 7. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že se přeměna ve třetím stupni provádí pomocí acylasy penicilínu G z mikroorganismu druhu Bacillus megaterium nebo Escherichia coli.
8. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že se biotransformace ve třetím stupni provádí při teplotě od 20 do 40 °C a při hodnotě pH od 5 do 9.
- 30 9. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že se přeměna ve čtvrtém stupni provádí v přítomnosti báze.
10. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že se přeměna ve čtvrtém stupni provádí v protickém rozpouštědle.

35

2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2

Konec dokumentu
