



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261797

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 C 177/00

(22) Přihlášeno 07 04 87
(21) PV 2483-87.N

(44) Zveřejněno 16 05 88

(45) Vydáno 15 06 89

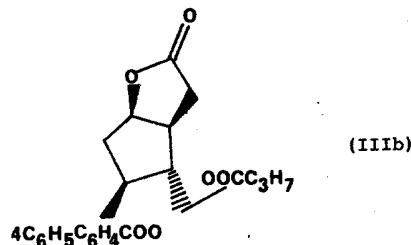
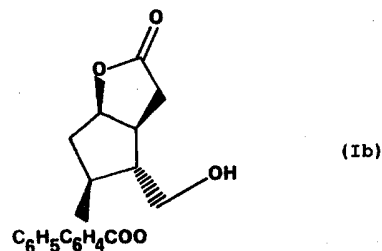
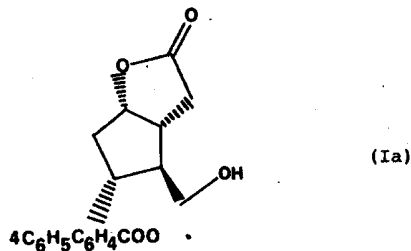
(75)

Autor vynálezu

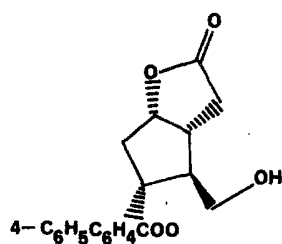
VESELÝ IVAN ing. CSc., ŽÁK BOHUMIL ing., ŠPAČEK MIROSLAV ing.,
NERATOVIC, MOSTECKÝ JIRÍ akademik, PALEČEK JAROSLAV doc. ing. CSc.,
KUBELKA VLADISLAV doc. RNDr. CSc., PRAHA, EICHLER PAVEL ing.,
MĚLNÍK

(54) Způsob štěpení racemické směsi laktonů

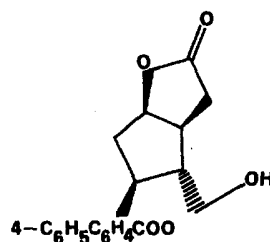
Řešení se týká štěpení racemické směsi laktonů, jehož podstata spočívá v tom, že v racemické směsi izomerů Coreyho laktonu vzorce Ia a Ib dochází působením glyceroltributyrátu v přítomnosti katalytického množství enzymu lipázy ke kvantitativní enantioselektivní esterifikaci (+)-izomeru vzorce Ib za vzniku odpovídajícího esteru vzorce IIIb. Z reakční směsi obsahující (-)-izomer Ia a (+)-izomer IIIb se jednotlivé čisté složky snadno separují pomocí chromatografických metod. Z esteru vzorce IIIb se transesterifikací alkoholem obsahujícím 1 až 3 atomy uhlíku získá žádaný (+)-izomer vzorce Ib.



Vynález se týká štěpení racemické směsi Coreyho laktonů vzorce Ia a Ib.



(Ia)



(Ib)

Uvedená racemická směs Coreyho laktonů je snadno dostupná a její příprava je předmětem řady publikací (např. Prostaglandins and Thromboxanes /Eds. S. M. Roberts, E. F. Newton/ Butterworths, London 1982; Chemistry and Biotechnology of Biological Active Natural Products Ed. Cs. Szántay), Academic Kiadó, Budapest 1984; Prostaglandins Synthesis /Ed. J. S. Bindra, R. Bindra/, Academic Press, Inc., New York 1977).

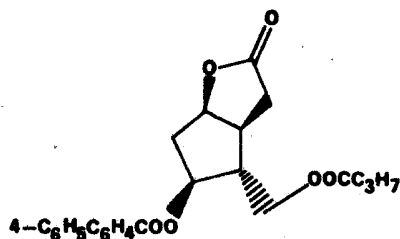
Opticky aktivní izomery Coreyho laktonu, zvláště (-)-izomer vzorce Ia představují důležitý meziprodukt při syntéze přírodních prostaglandinů a jejich syntetických analogů. Prostaglandiny tvoří v přírodě se vyskytující skupinu polyhydroxyderivátů nenasyčených mastných kyselin s širokým spektrem biologických účinků. Využívají se jako velmi účinná léčiva ve veterinární i humánní medicíně, především v porodnictví a gynekologii, při léčbě chorob krevního oběhu, při léčení poruch gastrointestinálního traktu a v řadě dalších aplikací. Z dosud známých způsobů výroby opticky aktivních izomerů vzorce Ia a Ib lze uvést štěpení ($\pm$)-3-oxotricyklo/2,2,1,0^{2,6}/heptan-7-karboxylové kyseliny pomocí L-(-)-alfa-methylbenzylaminu (US pat. spisy 3 992 438, 3 943 151; J. Amer. Chem. Soc. 95, 7 522 /1973/; J. Med. Chem. 23, 1 072 /1980/; Kexue Tongbao 27, 39 /1982/; Tetrahedron Lett. 34, 3 527 /1983/; AO 240 862 /1985/) a následující transformací opticky aktivních kyselin na sloučeniny vzorce Ia, resp. Ib. Analogický způsob byl použit při štěpení ($\pm$)-(5-benzyloxy-methyl-4-hydroxycyklopent-2-en-1-yl)octové kyseliny (US pat. spis 3 873 605 /1975/. Optický čistý izomer vzorce Ia byl dále připraven z (-)-/3a-alfa, 6a-alfa/-tetrahydro-2H-cyklopenta/b/-furan-2-onu Prinsovou reakcí (Tetrahedron Lett. 27, 4 639 /1976/. Jiný přístup k získání obou opticky aktivních izomerů vzorce Ia resp. Ib představuje mikrobiální redukce substituo- vaných bicyklo/2,2,1/heptan-2-onů (např. AO 225 987 /1984/, AO 236 386 /1985/). V poslední době popsané štěpení racemické směsi hemialkandiátů Coreyho laktonu pomocí aktivních bází (např. efedrinu, chininu, L-(-)-alfa-methylbenzylaminu) umožňuje získání obou enantiomerních laktonů vzorce Ia, resp. Ib AO 248 945, 249 098, 248 946. Alternativou tohoto postupu je i štěpení karboxylových derivátů Coreyho laktonu (Youji Hauxue 5, 371 /1984/, viz. Chem. Abstr. 102, 113 106 /1985/).

Výše uvedené způsoby výroby opticky aktivních forem Coreyho laktonu mají řadu nevýhod. Ve všech případech jsou založeny na pracných několikastupňových syntézách, často náročných na technologické zařízení. Další nevýhodou je použití relativně drahých opticky aktivních bází, z nichž mnohé jsou značně toxické a jejich zpětná regenerace je nákladná. Navíc oba optické izomery nelze obvykle současně získat v požadované čistotě použitím jediného štěpícího činidla.

Tyto nevýhody odstraňuje podstatným způsobem způsob štěpení racemické směsi Coreyho laktonů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že v racemické směsi izomerů Coreyho laktonů vzorce Ia a Ib dochází působením glyceroltributyátu (tributyřinu) vzorce II



V přítomnosti katalytického množství enzymu lipázy izolované z kvasinek *Candida cylindracea* (EC 3.1.1.3.) ke kvantitativní enantioselektivní esterifikaci (+)-izomeru vzorce Ib za vzniku odpovídajícího esteru vzorce IIIb



(IIIb)

Z reakční směsi obsahující (-)-izomer Ia a (+)-izomer vzorce IIIb se jednotlivé čisté složky snadno separují pomocí chromatografických metod. Z esteru vzorce IIIb se transesterifikací alkoholem obsahujícím 1 až 3 atomy uhlíku získá žádaný (+)-izomer vzorce Ib. Získané izomery Ia a Ib se rafinují krystalizací. Při způsobu podle vynálezu se postupuje tak, že se k 0,02 až 0,2 M roztoku racemické směsi izomerů Coreyho laktonů v nepolárním aprotickém rozpouštědle, s výhodou v chloralkanu, přidá glycerol tributyrát v hmotnostním poměru 1:2 až 6, dále se přidá lipáza v hmotnostním poměru 1:0,05 až 0,2 a heterogenní směs se míchá nebo třepe při teplotě 20 až 40 °C. Průběh reakce se sleduje pomocí chromatografických metod, s výhodou pomocí chromatografie na tenké vrstvě nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie. Po 8 až 48 hodinách, tj. po konverzi (+)-izomeru vzorce Ib, se katalyzátor oddělí pomocí filtrace nebo centrifugací a získaný roztok se přímo zpracuje technikou sloupcové chromatografie za použití silikagelu. Eluce se provádí rozpouštědly použitými při reakci, popřípadě ve směsi obsahující 2 až 5 % objemových methanolu nebo ethanolu. Prvá z eluovaných složek, ester vzorce IIIb, se po odpaření rozpouštědel za sníženého tlaku, event. po případném přečištění krystalizací, převede transesterifikací účinkem methanolu nebo ethanolu v přítomnosti katalytického množství, s výhodou 1 až 2 molových %, kyselých reagujících činidel, jako např. kyseliny sírové nebo iontoměnič. v H⁽⁺⁾ cyklu na opticky čistý (+)-izomer vzorce Ib. Opticky čistý (-)-izomer vzorce Ia reprezentující více polární složku dělené směsi, se získá přímo odpařením rozpouštědla z příslušné chromatografické frakce. Oba izomery vzorce Ia a Ib rafinují krystalizací, např. z ethanolu. Při vlastní reakci se jako halogenalkany používají dichlormethan, chloroform nebo 1,2-dichlorethan, přičemž je výhodné rozpouštědlo i glycerol tributyrát před použitím několik hodin ekvilibrovat 0,1 M roztokem fosfátového pufru. Pro snadnější separaci katalyzátoru je výhodné zakotvit lipázu na inertním nosiči, jako jsou látky na bázi polymerů a kopolymerů styrenu. Takto upravený katalyzátor lze snadno regenerovat a znovu použít při následné esterifikaci bez výrazného úbytku jeho katalytické aktivity.

Postup podle vynálezu je výhodný zejména tím, že používá snadno dostupných a levných reagentů a rozpouštědel, která se dají v převážné míře snadno regenerovat. Po technologické stránce nejsou na zařízení kladeny žádné speciální nároky, veškeré operace jsou bezpečné a nedochází k tvorbě toxických odpadních produktů ohrožujících životní prostředí.

Účinky vynálezu jsou ilustrovány na několika konkrétních příkladech provedení, které žádným způsobem neomežují rozsah předmětu vynálezu.

P ř í k l a d 1

Do 100 ml baňky byl předložen roztok 2 g racemického Coreyho laktonu ve 40 ml 1,2-dichlorethanu, dále bylo přidáno 400 mg lipázy (EC 3.1.1.3, výrobek firmy Sigma, katalog. číslo L 1 754) dobře promíchané se 2 g Sorsilenu, 8 ml glycerol tributyrátu (ekvilibrovaného

třepáním s 2 ml 0,1 M roztoku fosfátového pufru) a směs byla třepána při 35 °C po dobu 30 hodin, kdy obsahovala 50 % výchozího substrátu. Suspenze byla odstředěna, supernatant byl odlit a zbytek po rozmíchání s 20 ml 1,2-dichlorethanu znovu odstředěn. Supernatant byl přidán k původnímu podílu a regenerovaný enzym byl použit v dalším cyklu. Chromatografickým zpracováním supernatantu na koloně (průměr 25 mm, délka 50 cm) naplněné 25 g silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii byla nejprve eluována frakce 150 ml EDC (ethylen-dichlorid) obsahující ester vzorce IIIb, pak použitím soustavy EDC + 5 % objemových methanolu byla eluována frakce obsahující (-)-izomer vzorce Ia. Odpařením esterové frakce za vakua a rekrystalizací mazlavých krystalů (1,3 g) ze směsi n-hexanu (4 ml) a etheru (4 ml) bylo získáno 0,95 g prakticky čistého esteru II s teplotou tání 69 až 72 °C, $[\alpha]_D^{21} = 57,8^\circ$ /c = 1, CHCl₃/. Ester II (0,8 g) byl rozpuštěn ve 20 ml methanolu, pak byl přidán 1 g katexu Amberlite IR 120 v H⁽⁺⁾ cyklu a směs byla za míchání vařena pod zpětným chladičem po dobu 16 hodin. Po ochlazení směsi byl iontoměnič odfiltrován a filtrát byl odpařen za vakua. Rekrystalizací zbytku z 3 ml ethanolu bylo získáno 0,51 g čistého (+)-Coreyho laktonu vzorce Ib, $[\alpha]_D^{22} = 83,1^\circ$ /c = 1, CHCl₃/, teplota tání = 130 až 132 °C. Odpařením alkoholické chromatografické frakce za vakua a rekrystalizací zbytku (1,05 g) ze 4 ml ethanolu bylo získáno 0,75 g (-)-Coreyho laktonu vzorce Ia, $[\alpha]_D^{22} = -83,7^\circ$ /c = 1, CHCl₃/, teplota tání = 131 až 132 °C.

P ř í k l a d 2

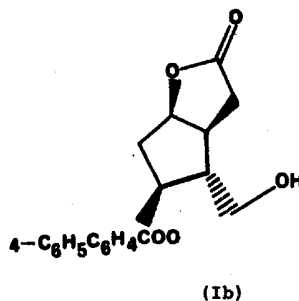
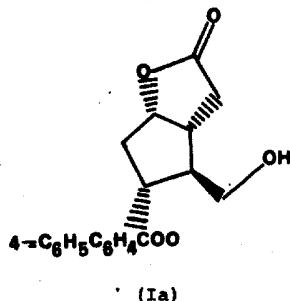
Ve 100 ml baňce byly rozpuštěny 2 g racemického Coreyho laktonu v 50 ml dichlormethanu, dále bylo přidáno 200 mg lipázy zakotvené na 2 g Chromosorbu 101, 8 ml ekvilibrovaného glycerol tributirátu a směs byla míchána při 22 °C 48 hodin. Po této době obsahovala dle vysokotlaké kapalinové chromatografické analýzy (kolona plněná silikagelem 5 m, 150 mm x 3,2 mm, eluet n-hexan a ethanol v poměru 9:1, 1 ml/min, 254 nm) 52 % substrátu. Postupem jako v příkladu 1 bylo získáno 0,9 g esteru vzorce IIIb a 0,72 g (-)-Coreyho laktonu vzorce Ia. Transesterifikace 0,8 g esteru IIIb v 20 ml ethanolu obsahujícího 0,2 ml koncentrované kyseliny sírové, byla ukončena po 8 hodinách varu směsi pod refluxem. Pak byla kyselina neutralizována 0,5 ml triethylenaminu a roztok odpařen za vakua. Odparek byl extrahován 10 ml chloroformu a extrakt byl znovu odpařen za vakua. Rekrystalizace zbytku ze 3 ml ethanolu poskytla 0,5 g (+)-izomeru Coreyho laktonu vzorce Ib.

P ř í k l a d 3

Ve 100 ml baňce bylo smícháno 40 ml 1,2-dichlorethanu, 2 g racemického Coreyho laktonu, 4 ml ekvilibrovaného glycerol tributirátu a regenerovaný katalyzátor z příkladu 1. Směs byla třepána při 25 °C. Po 41 hodinách bylo dosaženo 53,7 % konverze (sledováno vysokotlakou kapalinovou chromatografickou analýzou). Další zpracování směsi bylo provedeno jako v příkladu 1.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

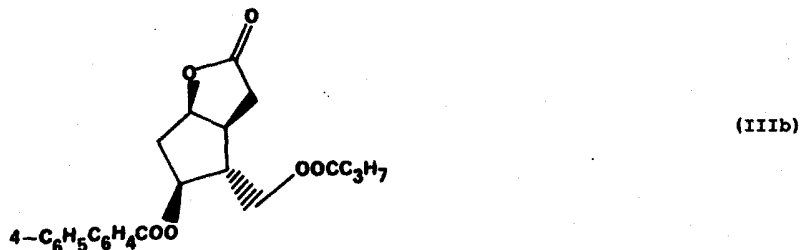
1. Způsob štěpení racemické směsi laktonů



vyznačený tím, že na racemickou směs Coreyho laktonů vzorců Ia a Ib se působí glyceroltributyratem vzorce II



v přítomnosti katalytického množství enzymu lipázy z kvasinek *Candida cylindracea* (EC 3.1.1.3) v prostředí aprotického rozpouštědla při teplotě 20 až 40 °C po dobu 5 až 48 hodin, čímž se (+)-izomer vzorce Ib převede na odpovídající ester vzorce IIIb



načež se po oddělení katalyzátoru filtrací nebo centrifugací izoluje z reakční směsi pomocí sloupcové chromatografie opticky čistý (-)-izomer vzorce Ia a ester (+)-izomeru vzorce IIIb, ze kterého se transesterifikací alkoholem obsahujícím 1 až 3 atomy uhlíku v přítomnosti kyselých reagujících katalyzátorů uvolní opticky aktivní (+)-izomer vzorce Ib a získané izomery vzorce Ia a Ib se rafinují krystalizací.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že se používají 0,02 až 0,2 M roztoky racemického Coreyho laktonu v methylenchloridu, chloroformu nebo 1,2-dichlorethanu, přičemž hmotnostní poměr reagujících složek - racemický Coreyho lakton : glycerol tributyrát : enzym - je 1:3 až 5:0,05 až 0,2.

3. Způsob podle bodu 1 a/nebo 2 vyznačený tím, že se použije enzym lipáza zakotvený na vhodném inertním nosiči jako jsou látky na bázi polymerů a kopolymerů styrenu.

4. Způsob podle bodu 1 a/nebo 2 a/nebo 3 vyznačený tím, že se jako kyselý katalyzátor při transesterifikaci použije minerální kyselina, s výhodou kyselina sírová, nebo iontoměnič v H⁽⁺⁾ cyklu jako např. polystyrensulfonové kyseliny.

5. Způsob podle bodu 1 a/nebo 2 a/nebo 3 a/nebo 4 vyznačený tím, že se rafinace optických izomerů Coreyho laktonu provede krystalizací z alkoholu obsahujícího 1 až 3 atomy uhlíku.

6. Způsob podle bodu 1 a/nebo 2 a/nebo 3 a/nebo 4 a/nebo 5 vyznačený tím, že se při reakci použité rozpouštědlo glyceroltributyratem před použitím několik hodin ekvilibruje s 0,1 M roztokem fosfátového pufru.