

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) SI 20874 A

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **200120003**

(51) MPK: **C07D 319/06**, C07M 7:00,
C12P 7/24

(22) Datum prijave: **05.06.2001**

(45) Datum objave: **31.10.2002**

(86) Mednarodna patentna prijava:
05.06.2001 WO PCT/JP01/04729

(30) Prednostna pravica:
05.06.2000 JP 2000-168285

(87) Objava mednarodne patentne prijave:
WO 01/94337, 13.12.2001

(72) Izumitelji: **NISHIYAMA Akira, Kakogawa-shi, Hyogo 675-0016, JP;**
HORIKAWA Miho, Tarumi-ku, Kobe-shi, Hyogo 655-0872, JP;
YASOHARA Yoshihiko, Himeji-shi, Hyogo 670-0942, JP;
UEYAMA Noboru, Kita-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-1211, JP;
INOUE Kenji, Kakogawa-shi, Hyogo 675-0039, JP

(73) Imetnik: **KANEKA CORPORATION,**
2-4, Nakanoshima 3-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP

(74) Zastopnik: **Patentna pisarna d.o.o., Čopova 14 p.p. 1725, 1001 Ljubljana, SI**

(54) **POSTOPEK ZA PRIPRAVO OPTIČNO AKTIVNIH DERIVATOV 2-(6-(HIDROKSI-METIL)-1,3-DIOKSAN-4-IL) OCETNE KISLINE**

(57) S predloženim izumom zagotavljamo proizvodno tehnologijo, s katero lahko proizvedemo optično aktivne derivate 2-(6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il) očetne kisline, ki so pomembni farmacevtski intermedii, iz poceni in lahko dosegljivih izhodnih materialov brez uporabe kakršnekoli posebne naprave, kot je ultra nizkotemperaturni reaktor. Predloženi izum je proizvodni postopek za optično aktivni derivat 2-(6-hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il) očetne kisline, ki obsega reakcijo enolata, pripravljenega s tem, da dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina deluje na estrski derivat očetne kisline, z (S) - beta - hidroksi - gama-

butirolaktonom pri temperaturi, ki ni nižja od -30 stopinj Celzija, da dobimo derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, obdelovanje le-tega z acilnim sredstvom v navzočnosti baze, da lahko proizvedemo monoacilni derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, reduciranje te spojine z mikroorganizmom, da proizvedemo monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline, obdelovanje te spojine z reagentom, ki tvori acetal, v navzočnosti kislinskega katalizatorja, da proizvedemo derivat aciloksimetildioksanil očetne kisline, in končno izpostavitev te spojine solvolizi v navzočnosti baze.

SI 20874 A

Postopek za pripravo optično aktivnih derivatov 2-[6-(hidroksi-metil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

Predloženi izum se nanaša na postopek za proizvodnjo farmacevtskih intermediatov, zlasti optično aktivnih derivatov 2-[6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline, ki so pomembni kot intermedii za HMG-CoA reduktazne inhibitorje.

Do sedaj znana tehnologija za proizvodnjo derivatov 2-[6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline vključuje naslednje postopke.

(1) Postopek, pri katerem izhajajo iz 3-hidroksi- γ -butirolaktona, da sintetizirajo estrski derivat 3,5,6-trihidroksiheksanojske kisline preko estrskega derivata 3,5-dihidroksiheksanojske kisline (JP-A-04-173767).

(2) Postopek, pri katerem izhajajo iz 3,4-dihidroksibutironitril acetonida, da sintetizirajo estrski derivat 3,5,6-trihidroksiheksanojske kisline preko estrskega derivata 3,5-dihidroksiheksanojske kisline (JP-A-02-262537).

(3) Postopek, pri katerem izhajajo iz estra 4-kloroacetoocetne kisline, da sintetizirajo estrski derivat 3,5,6-trihidroksiheksanojske kisline z benziloksilacijo, redukcijo, razširitvijo verige in podobnimi stopnjami. (JP-A-06-65226).

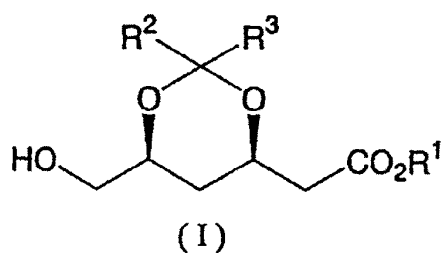
(4) Postopek, pri katerem izhajajo iz estra 4-kloro-3-hidroksimaslene kisline, da sintetizirajo estrski derivat 3,5,6-trihidroksiheksanojske kisline z razširitvijo verige, redukcijo in podobnimi stopnjami (USP 5278313).

(5) Postopek, pri katerem izhajajo iz jabolčne kisline, da sintetizirajo estrski derivat 3,5,6-trihidroksiheksanojske kisline preko derivata 2,4-dihidroksiadipinske kisline (JP-A-04-69355).

Ti postopki pa vključujejo reakcije pri ultra nizki temperaturi, približno $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, v katerikoli stopnji posameznih proizvodnih postopkov (1, 2, 4 in 5) ali reakcijo hidrogeniranja pri visokem tlaku, pri čemer je potreben tlak v višini $1 \cdot 10^7\text{ Pa}$ (100 kg/cm^2) (3), tako da je vedno potrebna izjemna reakcijska naprava. Poleg tega se v

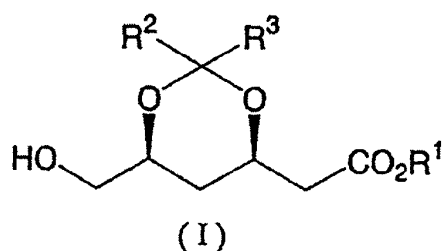
katerikoli stopnji uporabljajo dragi izhodni materiali, tako da nobeden od postopkov ni dovolj učinkovit za proizvodnjo v industrijskem obsegu.

V zgornjem stanju tehnike je predmet predloženega izuma, da zagotovimo proizvodno tehnologijo, s katero bi proizvedli enostavno in z visokim učinkom optično aktivne derivate 2-[6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline, prikazane z naslednjo formulo (I), iz poceni izhodnih materialov in brez uporabe kakršnekoli posebne naprave, kot je npr. ultra nizkotemperaturni reaktor;



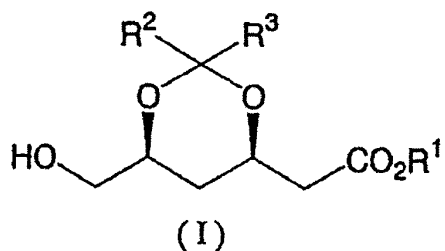
v formuli R^1 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^2 in R^3 vsak neodvisno pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^2 in R^3 pa lahko skupaj tvorita obroč.

V teh razmerah smo izumitelji predloženega izuma izvedli intenzivne raziskave in tako razvili prikladno tehnologijo za proizvodnjo optično aktivnih derivatov 2-[6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline z naslednjo formulo (I) iz poceni in lahko dosegljivih izhodnih materialov brez uporabe kakršnekoli posebne naprave, kot je ultra nizkotemperaturni reaktor;



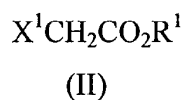
v formuli R^1 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^2 in R^3 vsak neodvisno pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^2 in R^3 pa lahko skupaj tvorita obroč.

Predloženi izum je tako usmerjen na proizvodni postopek za optično aktivni derivat 2-[6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline, prikazan s splošno formulo (I):

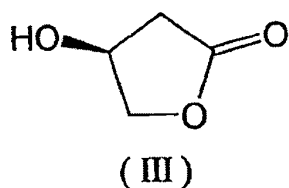


v formuli so R^1 , R^2 in R^3 , kot je definirano zgoraj, ki obsega

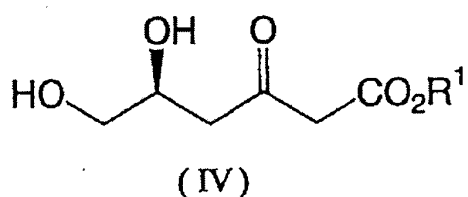
(1) reakcijo enolata, pripravljenega tako, da dopustimo, da deluje baza ali 0-valentna kovina na estrski derivat očetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (II):



v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj, in X^1 pomeni atom vodika ali halogena, z (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktonom, prikazanim z naslednjo formulo (III):

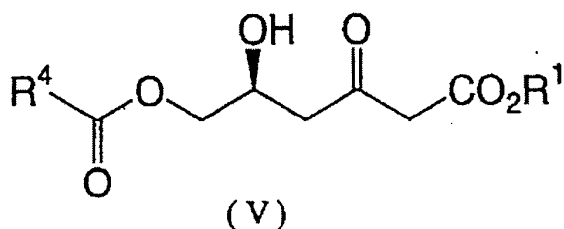


pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (IV):



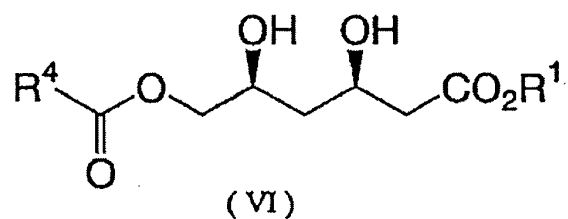
v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj,

(2) obdelovanje te spojine z acilirnim sredstvom v navzočnosti baze, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (V):



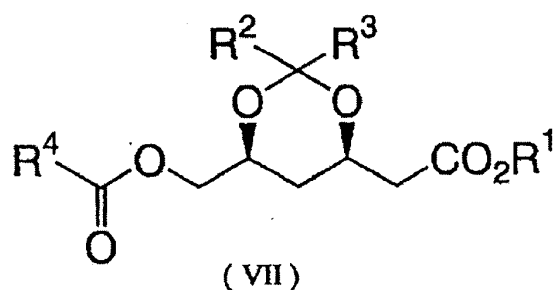
v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj; R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika,

(3) redukcijo te spojine z mikroorganizmom, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (VI):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj,

(4) obdelovanje te spojine z reagentom, ki tvori acetal, v navzočnosti kislinskega katalizatorja, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (VII):

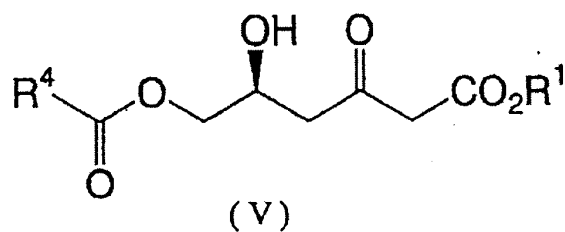


v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj,

in (5) izpostavitve te spojine solvolizi v navzočnosti baze.

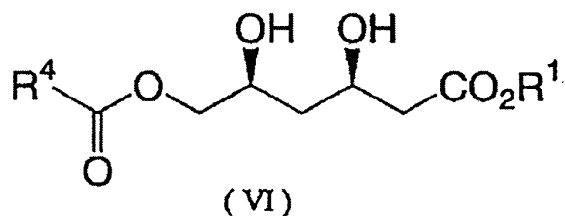
Predloženi izum je usmerjen tudi na izolacijski/čistilni postopek,

ki obsega obdelovanje spojine, kontaminirane z nečistočo in prikazane z naslednjo formulo (V):

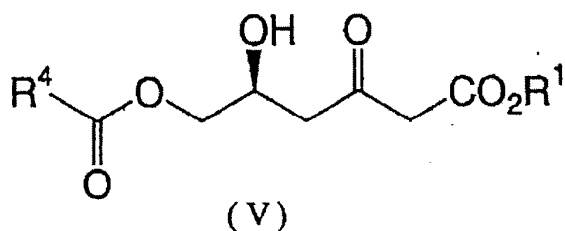


v formuli R^1 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 in 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 in 12 atomi ogljika,
z alifatskim ogljikovodikovim topilom, da odstranimo nečistočo, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (V), in pridobivanje spojine, prikazane z zgornjo formulo (V), v kristalni obliki.

Nadalje je predloženi izum usmerjen na proizvodni postopek za spojino, prikazano z naslednjo formulo (VI):

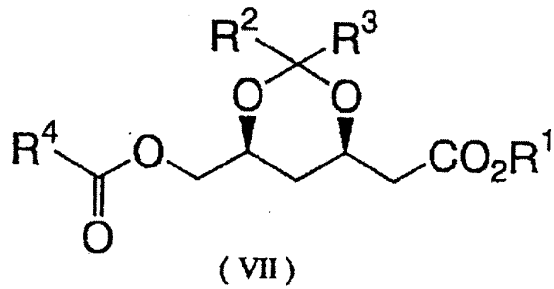


v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj, ki obsega redukcijo spojine, prikazane z naslednjo formulo (V):

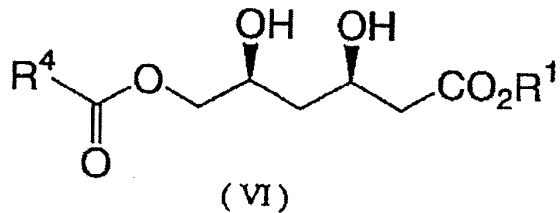


v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj, z mikroorganizmom.

Z drugega vidika je predloženi izum usmerjen na proizvodni postopek za spojino, prikazano z naslednjo formulo (VII):

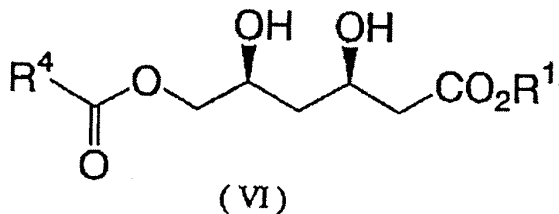


v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj,
ki obsega obdelovanje spojine, prikazane z naslednjo formulo (VI):



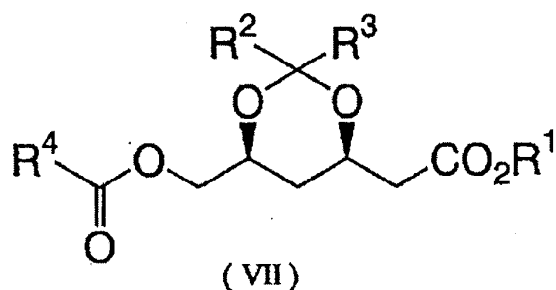
v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj,
z reagentom, ki tvori acetal, z uporabo aminske soli, sestavljene iz kisline in amina,
kot katalizatorja.

Še z nadaljnjega vidika je predloženi izum usmerjen na izolacijski/čistilni postopek,
ki obsega obdelovanje spojine, prikazane z naslednjo formulo (VI):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj,

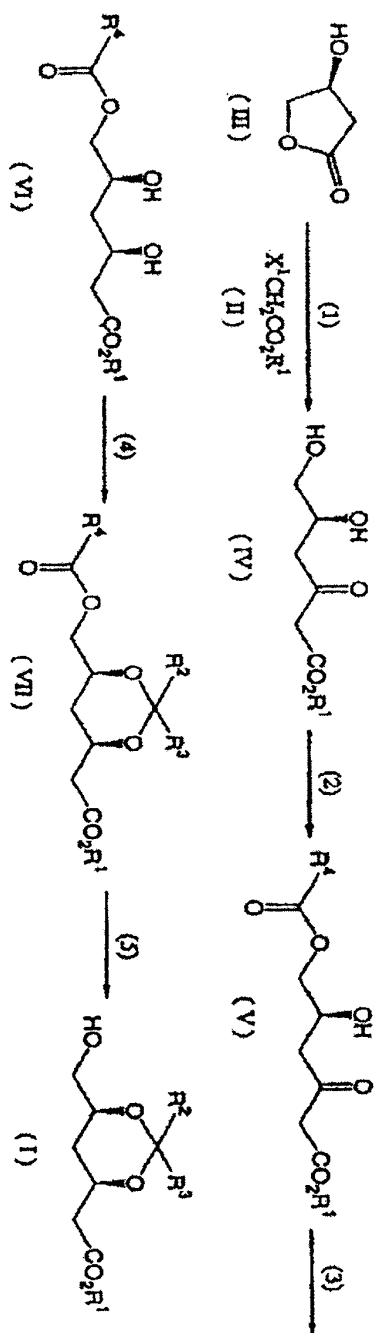
z reagentom, ki tvori acetal, v navzočnosti kislinskega katalizatorja, da tako pretvorimo le-to v spojino, prikazano z naslednjo formulo (VII):



v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, obdelovanje spojine, kontaminirane z nečistočo in prikazane z zgornjo formulo (VII), z alifatskim ogljikovodikovim topilom, da odstranimo nečistočo, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (VII), in pridobivanje spojine, prikazane z zgornjo formulo (VII), v kristalni obliki.

Predloženi izum je sedaj podrobno opisan.

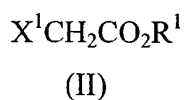
Kot je ponazorjeno na sledeči reakcijski shemi, obsega predloženi izum pet ne-ultra nizkotemperaturnih reakcijskih stopenj (1) do (5).



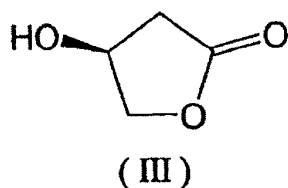
Predloženi izum je sedaj podrobno opisan od stopnje do stopnje.

Stopnja (1)

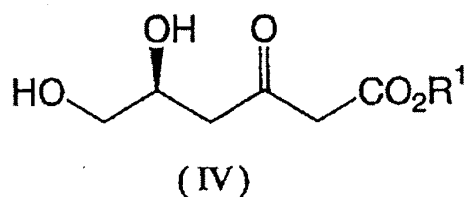
V tej stopnji enolat, pripravljen tako, da dopustimo, da deluje baza ali 0-valentna kovina na estrski derivat očetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (II):



reagira z (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktonom, prikazanim z naslednjo spojino (III):



pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^\circ\text{C}$, da proizvedemo (5S)-konfiguriran derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, prikazan z naslednjo formulo (IV):



Na splošno, kadar se reakcijo, ki vključuje enolat estra očetne kisline ali podobno, izvaja kot ne-ultra nizkotemperaturno reakcijo, npr. pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^\circ\text{C}$, prednostno pride do samokondenzacije enolata, ki povzroči opazno izgubo konverzijskega deleža te reakcije. Vendar pa smo ugotovili, da lahko z naslednjo

tehniko, ki smo jo razvili izumitelji, samokondenzacijo enolata očetne kisline zmanjšamo in lahko obravnavano reakcijo izvedemo z dobrim dobitkom produkta.

(S)- β -hidroksi- γ -butirolakton, ki ga uporabimo v stopnji (1), lahko proizvedemo v velikem obsegu z znano tehnologijo (npr. SYNTHETIC COMMUNICATION, 1986, 16, 183).

V omenjenem estrskem derivatu očetne kisline za uporabo v stopnji (1), R^1 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika, bolj podrobno pomeni vodik, metilno, etilno, i-propilno, terc.-butilno, n-oktilno, fenilno, naftilno, p-metoksifenilno, p-nitrobenzilno in podobne skupine. Prednostna je terc.-butilna skupina. X^1 pomeni atom vodika ali halogena, bolj podrobno pa vključuje vodik, klor, brom in jod, prednostno vodik in brom.

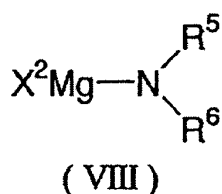
Nivo uporabe estrskega derivata očetne kisline glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton je od 1 do 10 molskih ekvivalentov, prednostno od 1 do 5 molskih ekvivalentov.

V stopnji (1) dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina deluje na estrski derivat očetne kisline, da pripravimo enolat. Na splošno pri pripravi enolata uporabimo bazo, kadar X^1 v estru očetne kisline pomeni vodik; 0-valentno kovino pa uporabimo pri pripravi enolata, kadar je X^1 atom halogena.

Baza, ki jo uporabimo pri pripravi enolata, vključuje npr. litijeve amide, kot npr. litijev amid, litijev diizopropilamid, litijev dicikloheksilamid, litijev heksametildisilazid itd.; magnezijeve amide, kot npr. kloromagnezijev diizopropilamid, bromomagnezijev diizopropilamid, jodomagnezijev diizopropilamid, kloromagnezijev dicikloheksilamid itd.; natrijeve amide, kot npr. natrijev amid, natrijev diizopropilamid, itd.; kalijeve amide, kot npr. kalijev amid, kalijev diizopropilamid itd.; alkillitij, kot npr. metillitij, n-butillitij, fenillitij, terc.-butillitij, itd.; Grignardove reagente, kot npr. metilmagnezijev bromid, fenilmagnezijev klorid, izo-propilmagnezijev klorid, terc.-

butilmagnezijev klorid itd.; kovinske alkoksidge, kot npr. natrijev metoksid, magnezijev etoksid, kalijev terc.-butoksid itd.; in kovinske hidride, kot npr. litijev hidrid, natrijev hidrid, kalijev hidrid, kalcijev hidrid itd. Prednostni so kovinski hidridi, magnezijevi amidi, litijevi amidi in Grignardovi reagenti. Te baze lahko uporabimo vsako neodvisno ali v kombinaciji. Litijev amid ali kovinski hidrid je npr. učinkovit, kadar ga uporabimo v kombinaciji z bazo, ki vsebuje magnezij, kot je npr. Grignardov reagentov ali magnezijev amid. Poleg tega lahko bazo, ki vsebuje magnezij, pripravimo *in situ* iz baze in magnezijeve spojine, kot je npr. magnezijev klorid, magnezijev bromid ipd.

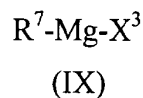
Magnezijev amid je prikazan s splošno formulo (VIII):



v zgornji formuli R^5 in R^6 vsak neodvisno pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika, aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika ali sililno skupino. Podrobno lahko tukaj omenimo metilno, etilno, i-propilno, terc.-butilno, cikloheksilno, n-oktilno, fenilno, naftilno, p-metoksifenilno, p-nitrobenzilno, trimetilsililno, trietilsililno, fenildimetilsililno in podobne skupine. Prednostna je izopropilna skupina. X^2 pomeni atom halogena in je prednostno klor, brom ali jod. Bolj prednosten je klor.

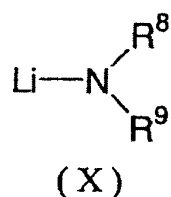
Razumljivo je, da lahko magnezijev amid pripravimo iz poceni in lahko dosegljivega sekundarnega amina in Grignardovega reagenta po znani tehnologiji, (npr. JP-A-08-523420). Alternativno ga lahko pripravimo iz litijevega amida in magnezijevega halogenida po znani tehnologiji (npr. J. Org. Chem. 1991, 56, 5978-5980).

Grignardov reagent je prikazan z naslednjo formulo (IX):



v zgornji formuli R^7 pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika. Podrobno lahko omenimo metilno, etilno, n-propilno, i-propilno, n-butilno, terc.-butilno, n-oktilno, fenilno, naftilno, p-metoksifenilno, p-nitrobenzilno in podobne skupine. Prednostne skupine vključujejo metilno, etilno, i-propilno, n-butilno, terc.-butilno itd. X^3 pomeni atom halogena, prednostno klor, brom ali jod. Bolj prednosten je klor.

Litijev amid je prikazan s splošno formulo (X):



v zgornji formuli R^8 in R^9 vsak neodvisno pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika, aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika ali sililno skupino. Podrobno lahko omenimo metilno, etilno, i-propilno, terc.-butilno, cikloheksilno, n-oktilno, fenilno, naftilno, p-metoksifenilno, p-nitrobenzilno, trimetilsililno, trietilsililno, fenildimetilsililno in podobne skupine. Prednostna je izopropilna skupina.

Nivo uporabe baze v stopnji (1) glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton je od 1 do 20 molskih ekvivalentov, prednostno od 2 do 8 molskih ekvivalentov.

0-valentna kovina, uporabna pri pripravi enolata iz stopnje (1), vključuje cink, magnezij, kositer itd., čeprav sta cink in magnezij prednostna. Nivo uporabe 0-

valentne kovine glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton je od 1 do 20 molskih ekvivalentov, prednostno od 2 do 8 molskih ekvivalentov.

Topilo, uporabno v stopnji (1), vključuje npr. aprotična organska topila. Kot organska topila lahko omenimo, npr. ogljikovodikova topila, kot so benzen, toluen, n-heksan, cikloheksan, itd.; etrska topila, kot npr. dietil eter, tetrahidrofuran, 1,4-dioksan, metil t-butil eter, dimetoksietan, etilen glikol dimetil eter, itd.; halogenirana ogljikovodikova topila, kot so metilen klorid, kloroform, 1,1,1-trikloroetan itd.; in aprotična polarna topila, kot so dimetilformamid, N-metilpirolidon, heksametilfosforjev triamid itd. Zgornja topila lahko uporabimo vsakega neodvisno ali v kombinaciji dveh ali več vrst. Prednostna med zgoraj omenjenimi topili so ogljikovodikova topila, kot npr. benzen, toluen, n-heksan, cikloheksan itd.; in etrska topila, kot npr. dietil eter, tetrahidrofuran, 1,4-dioksan, metil t-butil eter, dimetoksietan, dietilen glikol dimetil eter itd. Bolj prednostna so polietrska topila, kot npr. dimetoksietan, dietilen glikol dimetil eter itd. Ta polietrska topila lahko uporabimo vsakega kot edino topilo ali jih dodamo kot dodatke v drugo reakcijsko topilo pri nivoju od pribl. 1 do pribl. 10 molskih ekvivalentov glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton.

Reakcijska temperatura, ki jo je treba uporabiti v stopnji (1), je prednostno od -30 °C do 100 °C, bolj prednostno od -10 °C do 60 °C.

V stopnji (1) je lahko vrstni red mešanja reaktantov naključen, prednostno pa je, da obdelamo (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton z bazo, bolj prednostno z bazo in magnezijevo spojino, vnaprej. Prednostna baza vključuje kovinske hidride in litijeve amide. Prednostna magnezijeva spojina vključuje magnezijev klorid, magnezijev bromid, magnezijev sulfat itd. Uporabimo lahko bazo, ki vsebuje magnezij, tako da se bo podvojila kot baza in magnezijeva spojina. Baza, ki vsebuje magnezij, vključuje npr. Grignardove reagente, kot npr. metilmagnezijev bromid, izo-propilmagnezijev klorid, fenilmagnezijev klorid, terc.-butilmagnezijev klorid itd., in magnezijeve amide, kot npr. kloromagnezijev diizopropilamid, bromomagnezijev diizopropilamid,

jodomagnezijev diizopropilamid, kloromagnezijev dicikloheksilamid itd. Prednosten je terc.-butilmagnezijev klorid.

Nivo uporabe baze pri tej predobdelavi glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton je od 0,01 do 3 molske ekvivalente, prednostno od 0,5 do 1,5 molskega ekvivalenta.

Nivo uporabe magnezijeve spojine pri predobdelavi glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton je od 0,01 do 3 molske ekvivalente, prednostno od 0,5 do 1,5 molskega ekvivalenta.

Nivo uporabe baze, ki vsebuje magnezij, pri predobdelavi glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton je od 0,01 do 3 molske ekvivalente, prednostno od 0,5 do 1,5 molskega ekvivalenta.

Predobdelavo (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona z bazo lahko izvedemo v mešani raztopini iz (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona in estrskega derivata očetne kisline. Po predobdelavi lahko reakcijo vodimo z dodajanjem baze po kapljicah, kot npr. litijevega amida, npr. litijevega amida, litijevega diizopropilamida, litijevega dicikloheksilamida, litijevega heksametilidisilazida ali podobnih, ali magnezijevega amida, npr. diizopropilmagnezijevga klorida, diizopropilmagnezijevga bromida ali podobnih, ali raztopine baze.

Nivo baze, ki mora reagirati po predobdelavi, je glede na (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton od 1 do 20 molskih ekvivalentov, prednostno od 2 do 8 molskih ekvivalentov.

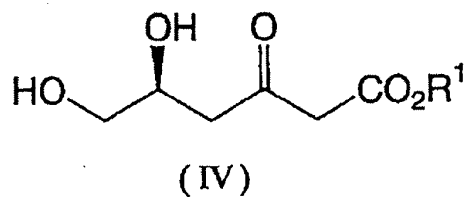
Tako lahko stopnjo (1) izvedemo ugodno s predobdelavo (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona z bazo in magnezijevo spojino vnaprej, nato pa dopustimo, da baza deluje v navzočnosti estrskega derivata očetne kisline. Alternativno lahko obdelamo (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton z bazo vnaprej in ga izpostavimo reakciji z enolatom,

pripravljenim tako, da dopustimo, da 0-valentna kovina deluje na estrski derivat očetne kisline.

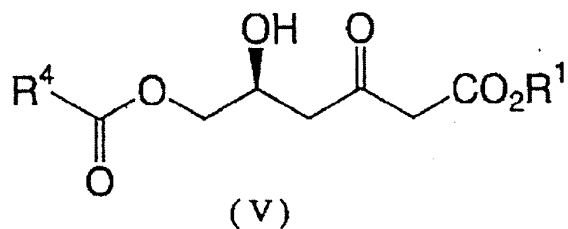
Kasnejša obdelava po stopnji (1) je lahko katerakoli kasnejša obdelava, ki jo na splošno izvedemo za rekuperiranje produkta iz reakcijske zmesi. Reakcijsko zmes, ki je na voljo po dokončani reakciji, lahko npr. zmešamo z navadnim anorganskim ali organskim topilom, npr. klorovodikovo kislino, žveplovo kislino, dušikovo kislino, očetno kislino ali citronsko kislino, temu pa sledi ekstrakcija z običajnim topilom za ekstrakcijo, npr. etilacetatom, dietiletrom, metilenkloridom, toluenom ali heksanom. Iz tako dobljenega ekstrakta odstranimo reakcijsko topilo in topilo za ekstrakcijo s segrevanjem pri znižanem tlaku ali podobnim postopkom, da dobimo obravnavano spojino. Obravnavano spojino, ki jo tako dobimo, lahko nadalje čistimo z znanimi tehnikami, kot so kristalizacija, frakcionirna destilacija ali kolonska kromatografija, lahko pa jo prenesemo direktno v naslednjo stopnjo brez izolacije.

Stopnja (2)

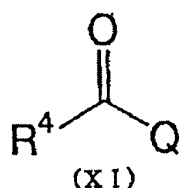
V tej stopnji obdelamo derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, prikazan z naslednjo formulo (IV):



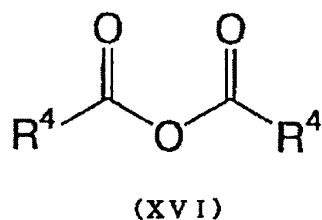
kot je dobljen v stopnji (1), z acilirnim sredstvom v navzočnosti baze, da proizvedemo monoacilni derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, prikazan z naslednjo formulo (V):



Kot acilirno sredstvo, uporabno v stopnji (2), lahko uporabimo katerokoli spojino, prikazano z naslednjo formulo (XI):



in spojino, prikazano z naslednjo formulo (XVI):



V zgornjih formulah R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika. Podrobno lahko omenimo vodik, metilno, etilno, n-propilno, i-propilno, n-butilno, terc.-butilno, n-oktilno, fenilno, naftilno, p-metoksifenilno, p-nitrobenzilno in podobne skupine. Prednostne so metilna, etilna, i-propilna, terc.-butilna in fenilna skupina, pri čemer je fenilna skupina posebno prednostna.

Q pomeni zapuščajočo skupino. Podrobno lahko pri tem omenimo atom halogena, npr. klor, brom, jod itd., alkoksikarboniloksi skupino, npr. metoksikarboniloksi,

etoksikarboniloksi, terc.-butoksikarboniloksi itd., ciano skupino, imidazolido skupino itd. Prednosten je klor.

Nivo uporabe acilirnega sredstva glede na derivat dihidroksioksoheksanojske kisline je prednostno od 0,5 do 2 molska ekvivalenta, bolj prednostno od 0,8 do 1,5 molskega ekvivalenta.

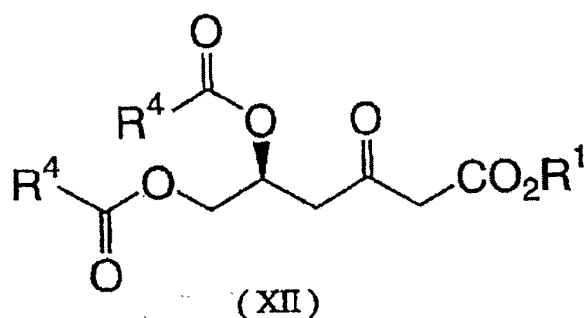
Baza, ki jo lahko uporabimo v stopnji (2), vključuje anorganske baze, kot npr. natrijev karbonat, kalijev karbonat, natrijev hidrogenkarbonat, kalijev hidrogenkarbonat, natrijev hidroksid, kalijev hidroksid, kalcijev hidroksid, litijev hidroksid, barijev hidroksid, magnezijev hidroksid itd.; amoniak in amine, kot npr. trietilamin, piridin, N-metilmorfolin, diizopropiletilamin, N,N-dimetilaminopiridin itd., pri čemer je prednosten trietilamin ali piridin. Nivo uporabe baze glede na derivat dihidroksioksoheksanojske kisline je prednostno od 1 do 10 molskih ekvivalentov, bolj prednostno od 1 do 3 molske ekvivalente.

Reakcijsko topilo, ki ga lahko uporabimo v stopnji (2), vključuje ogljikovodikova topila, kot so npr. benzen, toluen, cikloheksan, itd.; etrska topila, kot so dietil eter, tetrahidrofuran, 1,4-dioksan, metil terc.-butil eter, dimetoksietan itd.; etrska topila, kot so etil acetat, butil acetat itd.; ketonska topila, kot so aceton, metil etil keton, itd.; halogenirana ogljikovodikova topila, kot so metilen klorid, kloroform, 1,1,1-trikloroetan, itd.; topila, ki vsebujejo dušik, kot npr. dimetilformamid, acetamid, formamid, acetonitril itd.; in aprotična polarna topila, kot so dimetilsulfoksid, N-metilpirolidon, heksametilfosforjev triamid itd. Zgoraj omenjena organska topila lahko uporabimo vsakega neodvisno ali v kombinaciji dveh ali več vrst. Prednostni so toluen, etil acetat, aceton, metilen klorid, metil terc.-butil eter, tetrahidrofuran, dimetilformamid, acetonitril itd.

Reakcijska temperatura v stopnji (2) je od -30 °C do 80 °C, prednostno od -10 °C do 40 °C.

Kasnejša obdelava po stopnji (2) je lahko tista, ki jo na splošno izvedemo za rekuperiranje produkta iz reakcijske zmesi po dokončani reakciji. Reakcijski zmesi, ki je na voljo po dokončani reakciji, lahko npr. dodamo vodo in izvedemo postopek ekstrakcije z običajnimi topili za ekstrakcijo, kot so etilacetat, dietileter, metilenklorid, toluen, heksan ali podobni. Iz tako dobljenega ekstrakta odstranimo reakcijsko topilo in topilo za ekstrakcijo s segrevanjem pri znižanem tlaku ali podobnim postopkom, da dobimo obravnavano spojino.

Obravnavana spojina, ki jo tako dobimo, ima težnjo, da vsebuje različne nečistoče, ki izvirajo iz različnih razgradenj in stranskih reakcij, ki potekajo med proizvodnjo. Posebno diacilni derivat dihidroksioksoheksanojske kisline s splošno formulo (XII):



(R¹ in R⁴ sta, kot je definirano zgoraj) ima težnjo, da se tvori kot stranski produkt kot glavna nečistoča in zato da lahko izoliramo obravnavano spojino visoke kvalitete, moramo te nečistoče nekako odstraniti. Na splošno pa nečistočo, ki je strukturno podobna obravnavani spojini (strukturni analog), ni enostavno odstraniti in zato da lahko odstranimo take nečistoče, da dobimo obravnavano spojino z visoko čistoto, je potreben dober protokol za čiščenje in izolacijo. Izumitelji predloženega izuma smo ugotovili, da lahko navedene nečistoče učinkovito odstranimo z izvedbo postopka kristalizacije pri razmerah, opisanih spodaj.

Kristalizacijsko topilo za uporabo v predloženem izumu je prednostno alifatsko ogljikovodikovo topilo. Podrobno lahko omenimo alifatske ogljikovodike, ki

vsebujejo 5-20 atomov ogljika, kot npr. pentan, petroleter, neopentan, heksan, cikloheksan, metilcikloheksan, heptan, cikloheptan, oktan, izooktan, nonan, dekan, undekan, dodekan itd. Med temi so prednostni pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan in izooktan. Le-te lahko uporabimo vsakega neodvisno ali v kombinaciji dveh ali več vrst.

Posebno je v zvezi z enostavno odstranitvijo topila iz mokrih kristalov s sušenjem ali rekuperiranjem in ponovno uporabo topila (destilativno rekuperiranje) prednostno, da uporabimo topila, ki imajo primerjalno nizko vrelišče. Kot taka topila lahko na splošno omenimo tista, ki imajo vrelišče, ki ni višje od pribl. 100 °C pri atmosferskem ali podatmosferskem tlaku. Bolj prednostno lahko omenimo alifatska ogljikovodikova topila s 5 do 8 atomi ogljika, kot npr. pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan in izooktan itd., kadar pa je treba globalno upoštevati stroške za topilo, enostavnost ravnanja in druge faktorje, sta posebno prednostna heksan in metilcikloheksan.

Uporaba zgornjih alifatskih ogljikovodikovih topil zagotavlja stabilizacijo in gotovost za visok dobiček obravnavane spojine kot tudi visoko stopnjo čiščenja, to je učinkovito odstranitev različnih nečistoč, zlasti navedene spojine (XII). Nivo uporabe alifatskega ogljikovodikovega topila je pri dokončanem postopku za kristalizacijo spojine (V) prednostno tak, da se lahko ohrani fluidnost dobljenega produkta in je lahko npr. pribl. 5 do 20 masnih delov, ali v nekaterih primerih celo več, glede na spojino (V).

Za kristalizacijo spojine (V) lahko v predloženem izumu uporabimo kristalizacijo s hlajenjem, kristalizacijo s koncentriranjem in druge postopke za kristalizacijo, vsakega neodvisno ali v kombinaciji. Kristalizacija s koncentriranjem, navedena zgoraj, je lahko kristalizacijski postopek pri katerem raztopino, sestavljeno iz topila, ki je drugačno od alifatskega ogljikovodikovega topila, pretvorimo v raztopino, sestavljeno iz alifatskega ogljikovodikovega topila. Poleg tega lahko v tem kristalizacijskem postopku dodamo cepilne kristale.

V predloženem izumu lahko za izboljšanje vsaj enega parametra izmed topnosti, dobitka, obdelovalne koncentracije, učinka čiščenja (učinkovitost odstranitve nečistoč) in fizikalnih lastnosti dobljenih kristalov zgornje spojine (V), dodatno uporabimo pomožno topilo poleg alifatskega ogljikovodikovega topila pri izvajanju postopka kristalizacije. Zgornje pomožno topilo lahko dodamo v alifatsko ogljikovodiko topilo, kot je potrebno, ali lahko spojino (V) raztopimo v pomožnem topilu vnaprej in dodamo raztopino v alifatsko ogljikovodiko topilo.

Pomožno topilo, omenjeno zgoraj, ni posebno omejeno in vključuje npr. aceton, metil etil keton, tetrahidrofuran, metil terc.-butil eter, etil acetat, izopropil acetat, terc.-butil acetat, etanol, izopropanol, toluen, benzen, ksilen, klorobenzen, metilen klorid, kloroform in 1,2-dikloroetan itd. Le-ta lahko uporabimo vsakega neo-'visno ali v kombinaciji dveh ali več vrst. Med temi lahko etil acetat, toluen, metil terc.-butil eter, metilen klorid itd. prispevajo k povečani topnosti in izboljšanim obdelovalnim parametrom, kot sta npr. obdelovalna koncentracija in učinek čiščenja.

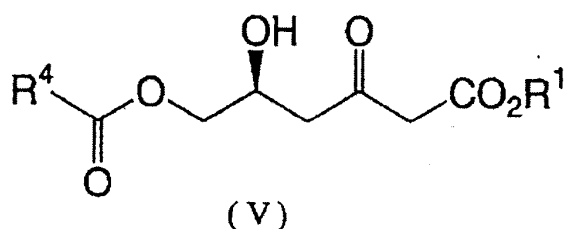
Pomožno topilo, omenjeno zgoraj, bolj izrazito učinkuje, kadar ga uporabimo v prikladni količini v kombinaciji z alifatskim ogljikovodikovim topilom, pri čemer prikladno količino določimo glede na lastnosti pomožnega topila v povezavi z želenim učinkom in drugimi faktorji. Optimalni nivo uporabe pomožnega topila lahko ugotovimo z enostavnim eksperimentiranjem. S stališča dobitka in učinka čiščenja je nivo uporabe zgornjega pomožnega topila prednostno tak, da masno razmerje pomožnega topila in alifatskega ogljikovodikovega topila (pomožno topilo/alifatsko ogljikovodiko topilo) ni večje od 1 pri dokončanem postopku za kristalizacijo spojine (V). Bolj prednosten nivo je tak, da je razmerje 0,5 ali manjše.

Postopek čiščenja/izolacije v smislu izuma lahko izvedemo pri pribl. sobni temperaturi. Kjer je potrebno, lahko izvedemo segrevanje ali ohlajanje pri temperaturi, ki npr. ni višja od pribl. 60 °C, navadno pri -30 °C do 50 °C.

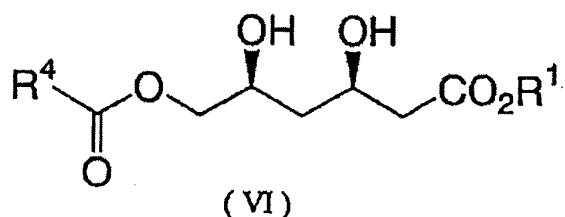
Tako dobljeno zgornjo spojino (V) ločimo s tehniko za ločevanje trdne snovi in tekočine, po izbiri pa temu nato sledi izpiranje kolača in sušenje. Tehnika za ločevanje trdne snovi in tekočine ni posebno omejena, vendar vključuje npr. filtracijo pod tlakom, sesalno filtracijo, centrifugiranje itd. Zgornje sušenje prednostno izvedemo pri znižanem tlaku (sušenje v vakuumu) pri temperaturi, ki ni višja od pribl. 60 °C, zato da se izognemo npr. pirolizi ali fuziji.

Stopnja (3)

V tej stopnji (5S)-konfiguriran monoacilni derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, prikazan z naslednjo formulo (V):



kot ga dobimo v stopnji (2), reduciramo z uporabo mikroorganizma, da dobimo (3R,5S)-konfiguriran monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline, prikazan z naslednjo formulo (VI):



Na splošno se uporablja za visoko stereoselektivno redukcijo karbonylne skupine monoacilnega derivata dihidroksioksoheksanojske kisline, kot je zgornja spojina, redukcijski postopek z uporabo redukcijskega sredstva hidridne vrste, kot je npr.

natrijev borohidrid, v navzočnosti alkilborana pri ultranizki temperaturi (npr. JP-A-02-262537).

Za stereoselektivno reduciranje monoacilnega derivata dihidroksioksoheksanojske kisline pri ne-ultra nizkotemperaturnih razmerah in z nizkimi stroški smo izumitelji predloženega izuma razvili redukcijski postopek z uporabo mikroorganizma.

Mikroorganizem, ki je sposoben reduciranja monoacilnih derivatov dihidroksioksoheksanojske kisline v ustrezne monoacilne derivate trihidroksiheksanojske kisline in ga je treba uporabiti v stopnji (3), lahko ugotovimo s postopki, opisanimi spodaj. Če uporabimo kvasovko kot primer, potem lahko uporabimo npr. postopek, ki obsega polnjenje velike preskusne cevi s 5 ml medija A (pH 7,0) s sestavo: glukoza 3 %, ekstrakt kvasovk 0,3 %, kalijev dihidrogenfosfat 0,7 %, diamonijev hidrogenfosfat 1,3 %, magnezijev sulfat · 7H₂O 0,08 %, cinkov sulfat · 7H₂O 0,007 %, železov sulfat · 7H₂O 0,009 %, bakrov sulfat · 5H₂O 0,0005 %, manganov sulfat · 4H₂O 0,001 % in natrijev klorid 0,01 %, steriliziranje medija, inokuliranje kvasovke, kultiviranje s stresanjem pri 27 °C od 2 do 3 dni, zbiranje zrastle celic s centrifugiranjem, suspendiranje celic v 0,5 ml fosfatnega pufra, ki vsebuje od 0,01 do 1 % terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline in 8 % glukoze, in stresanje suspenzije v veliki preskusni cevi pri 27 °C od 1 do 3 dni. Za identifikacijo obravnavane redukcijske sposobnosti reakcijsko zmes po kultiviranju s stresanjem ekstrahiramo z etil acetatom in organsko fazo analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti [kolona: Dovelosil ODS-HG-3 (4,6 mm x 150 mm) (proizvod od Nomura Chemical), eluent: 0,1 % trifluoroocetna kislina/acetonitril = 6/4, hitrost pretoka: 0,8 ml/min, detekcija: 210 nm, kolonska temperatura: sobna temperatura, elucijski čas: za terc.-butil ester (3S,5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline 10,1 min, za terc.-butil ester (3R,5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline 11,0 min in za (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline 16,7 min; razumljivo je, da so ti pogoji le za ponazoritev. Kadar je kandidatni mikroorganizem bakterijski sev, uporabimo npr. medij B (pH 7,0) s sestavo: glicerol 1,5 %, predekstrakt 1,0 % in ekstrakt kvasovk 0,5

% . V primeru glivnega seva uporabimo medij C (pH 6,0) s sestavo: glukoza 5 % in vodni racemat koruze 5 %. V primeru aktinomicet uporabimo medij D (pH 7,2) s sestavo: Difco-triptična sojina brozga 3 % in topni škrob 1 %. Z uporabo teh medijev kultiviramo posamezne seve mikroorganizmov in izberemo mikroorganizme, ki imajo obravnavano sposobnost, z enakim postopkom, kot je opisano zgoraj.

Mikroorganizem, ki ga lahko uporabimo v praksi predloženega izuma vključuje mikroorganizme, ki spadajo k rodovom: Ashbya, Botryosascus, Brettanomyces, Candida, Citeromyces, Clavispora, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Dipodascus, Galactomyces, Geotrichum, Hanseniaspora, Hansenula, Hormoascus, Hyphopichia, Issatchenkia, Kluyveromyces, Komagataella, Lipomyces, Metschnikowia, Nakazawaea, Ogataea, Pachysolen, Pichia, Rhodotorula, Rhodsporidium, Saccharomyces, Saccharomycodes, Saccharomycopsis, Saturnospora, Schizoblastosporion, Schizosaccharomyces, Schwanniomyces, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Torulaspora, Torulopsis, Trichosporon, Trigonopsis, Willopsis, Yamadazyma, Zygosaccharomyces, Acidiphilium, Aerobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Aureobacterium, Bacillus, Brevibacterium, Buttiauxella, Cedecea, Cellulomonas, Citrobacter, Clostridium, Comamonas, Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Luteococcus, Microbacterium, Micrococcus, Ochrobactrum, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Rhodococcus, Sarcina, Serratia, Sphingobacterium, Tsukamurella, Absidia, Acremonium, Aegerita, Agrocybe, Amylostereum, Aspergillus, Byssosclamyces, Chaetomidium, Chaetosartorya, Cladosporium, Coprinus, Crinipellis, Endophragma, Flavolus, Fomitopsis, Fusarium, Ganoderma, Glomerella, Laetiporus, Lentinus, Lenzites, Macrophoma, Monascus, Mortierella, Paecilomyces, Penicillium, Phialophora, Pholiota, Pleurotus, Scopulariopsis, Sehizophyllum, Sporotrichum, Zygorhynchus, Microtetraspora, and Streptomyces. More particularly, the usable are, for example, Ashbya gossypii IFO 0560, Botryosascus synnaedendrus IFO 1604, Brettanomyces custersianus IFO 1585, Candida arborea IAM 4147, Candida catenulata IFO 0745, Candida fennica CBS 6028, Candida galacta IFO 10031, Candida haemulonii IFO 10001, Candida magnoliae IFO 0705, Candida musae IFO 1582, Candida nitratophila IFO 10004, Candida parapsilosis IFO 0585, Candida pararugosa IFO 0966, Candida stellata IFO 0701, Citeromyces matritensis IFO 0651, Clavispora lusitaniae IFO 1019, Cryptococcus laurentii IFO 0609, Debaryomyces carsonii IFO 0795, Debaryomyces hansenii var. fabryi IFO 0794, Debaryomyces hansenii var.

hansenii IFO 0032, Debaryomyces hansenii var. hansenii IFO 0047, Debaryomyces hansenii var. hansenii IFO 0018, Debaryomyces kloeckeri, Debaryomyces marama IFO 0668, Debaryomyces pseudopolymorphus IFO 1026, Debaryomyces robertsiae IFO 1277, Debaryomyces sp. IFO 0025, Dekkera anomala IFO 0627, Dipodascus armillariae IFO 0102, Dipodascus ovetensis IFO 1201, Dipodascus tetrasperma CBS 765.70, Galactomyces reessii CBS 179.60, Geotrichum candidum CBS 187.67, Geotrichum fermentans IFO 1199, Geotrichum fragrans CBS 164.32, Geotrichum loubieri CBS 252.61, Hanseniaspora guilliermondii IAM 4972, Hansenula methanolosa, Hansenula polymorpha DL1 AKU4752, Hormoascus philentomus IFO 1847, Hormoascus platypodis IFO 1471, Hyphopichia burtonii IFO 0844, Issatchenkia orientalis IFO 1279, Issatchenkia terricola IFO 0933, Kluyveromyces lactis IFO 1012, Kluyveromyces marxianus IFO 0541, Kluyveromyces marxianus IFO 0288, Kluyveromyces polysporus IFO 0996, Kluyveromyces thermotolerans IFO 0662, Komagataella pastoris IFO 1013, Lipomyces starkeyi IFO 0678, Metschnikowia bicuspidata IFO 1408, Metschnikowia pulcherrima IFO 0561, Nakazawaea holstii IFO 0980, Ogataea minuta var. minuta IFO 0975, Ogataea pini IFO 1342, Ogataea polymorpha IFO 0799, Ogataea polymorpha IFO 1475, Ogataea wickerhamii IFO 1706, Pachysolen tannophilus IFO 1007, Pichia canadensis IFO 0976, Pichia farinosa IAM 4369, Pichia jandinii IFO 0987, Pichia saitoi IAM 4945, Pichia toletana IFO 0950, Pichia triangularis IFO 0836, Pichia wickerhamii IFO 1278, Rhodotorula graminis IFO 0190, Rhodotorula minuta IFO 0387, Rhodotorula minuta IFO 0715, Rhodsporidium diobovatum IFO 0688, Rhodsporidium toruloides IFO 0413, Saccharomyces bayanus IFO 0251, Saccharomyces pastorianus IFO 1265, Saccharomyces pastorianus ATCC 9080, Saccharomyces rosei IFO 0252, Saccharomyces sake, Saccharomyces steineri IAM 4608, Saccaromyces unisporus IFO 0215, Saccharomycodes ludwigii IFO 0339, Saccharomycopsis capsularis IFO 0672, Saccharomycopsis malanga IFO 1710, Saturnospora dispersa IFO 0035, Schizoblastosporion kobayasii IFO 1644, Schizosaccharomyces pombe IFO 0347, Schizosaccharomyces pombe IFO 0362, Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis IFO 1840, Sporidiobolus johnsonii IFO 6903, Sporobolomyces pararoseus IFO 0471, Sporobolomyces salmonicolor IFO 1038, Torulaspora delbrueckii IFO 0381, Torulopsis methanolevescens, Torulopsis osboenis IFO 0646, Torulopsis sp., Torulopsis uvae IFO 0649, Trichosporon pullulans, Trichosporon sp. Trigonopsis variabilis IFO 0671, Willopsis saturnus var. mrakii IFO 0895, Willopsis saturnus var. saturnus IFO 0992, Yamadazyma farinosa IFO 0459, Yamadazyma farinosa IFO 0602, Yamadazyma haplophila IFO 0947, Zygosaccharomyces naniwensis IFO 0524, Zygosaccharomyces sp. IFO 0522, Acidiphilium cryptum IFO 14242, Aerobacter cloacae

IAM 1221, Alcaligenes xylooxidans IFO 13495, Alcaligenes xylooxidans subsp. denitrificans IFO 12669, Alcaligenes xylooxidans subsp. denitrificans ATCC 15173, Arthrobacter globiformis ATCC 8010, Arthrobacter protophormiae IFO 12128, Aureobacterium esteraromaticum IFO 3752, Bacillus badius IAM 11059, Bacillus sphaericus IFO 3525, Brevibacterium ammomiagenes IFO 12071, Buttiauxella agrestis JCM 1090, Cedecea davisiae JCM 1685, Cellulomonas sp. JCM 2471, Cellulomonas turbata IFO 15015, Citrobacter freundii IFO 12681, Clostridium cylindrosporium IFO 13695, Comamonas testosteroni IFO 12047, Corynebacterium acetooacidophilum ATCC 21476, Corynebacterium ammoniagenes IFO 12072, Corynebacterium glutamicum ATCC 21269, Corynebacterium glutamicum ATCC 13287, Enterobacter aerogenes IFO 13534, Enterobacter cloacae IFO 12935, Erwinia carotovora subsp. carotovora IFO 3830, Escherichia coli IFO 12734, Flavobacterium flavescens, Klebsiella planticola IFO 3317, Luteococcus japonicus IFO 12422, Microbacterium arborescens IFO 3750, Micrococcus flavus, Micrococcus luteus IFO 13867, Ochrotrichum sp. IFO 12950, Proteus inconstans IFO 12931, Proteus mirabilis IFO 3849, Proteus rettgeri IFO 1350, Proteus vulgaris IFO 3167, Providencia stuartii IFO 12930, Pseudomonas aeruginosa IAM 1007, Pseudomonas putida IFO 14164, Pseudomonas stutzeri IFO 13596, Rhodococcus equi JCM 1313, Sarcina lutea, Serratia plymuthicum IFO 3055, Serratia proteamaculans subsp. proteamaculans IFO 12979, Sphingobacterium spiritivorum JCM 1277, Tsukamurella paurometabolum IFO 12160, Absidia orchidis HUT 1036, Acremonium bacillisporum IFO 9387, Aegerita candida IFO 6988, Agrocybe cylindracea IFO 30299, Amylostereum areolatum IFO 9221, Aspergillus parasiticus IFO 4403, Aspergillus phoenicis IFO 6670, Byssoschlamys fulva IFO 6307, Chaetomidium fimeti IFO 30419, Chaetosartorya stromatoides IFO 9652, Cladosporium resinae F. avellaneum IFO 6367, Coprinus cinereus TD-822, Coprinus lagopus IFO 9533, Coprinus sp., Crinipellis stipitaria IFO 30259, Endophragma alternata IFO 30204, Flavolus arcularius, Fomitopsis pubertatis, Fusarium merismoides IFO 30040, Ganoderma lucidum IFO 31863, Glomerella cingulata IFO 5257, Laetiporus sulphureus, Lentinus lepideus, Lenzites betulina IFO 8715, Macrophoma commelinae IFO 9569, Monascus purpureus IFO 5965, Mortierella isabellina IFO 7829, Paecilomyces varioti HUT 4028, Penicillium chermesinum IFO 5800, Penicillium chrysogenum IFO 4640, Penicillium expansum IFO 5854, Penicillium lilacinum IFO 31914, Phialophora fastigiata IFO 6850, Pholiota aurivella IFO 30265, Pholiota limonella IFO 31868, Pleurotus dryinus, Pleurotus ostreatus, Pleurotus porrigens, Scopulariopsis brevicaulis IFO 4843, Sehizophyllum commune IFO 6503, Sehizophyllum commune IFO 6504, Sporotrichum aurantiacum IFO 9381, Zygorhynchus moelleri HUT 1305, Microtetraspora

roseoviolacea IFO 14098, Streptomyces achromogenes subsp. rubradiris IFO 14000, Streptomyces sp. in Streptomyces aureus NIHJ 122.

Te mikroorganizme lahko na splošno dobimo iz zalog kultur, ki so z lahkoto dosegljive zastonj ali za plačilo. Prav tako jih lahko izoliramo iz naravnega stvarstva. V tej zvezi lahko te mikroorganizme po izbiri izpostavimo inducirani mutagenezi, da dobimo seve, ki imajo lastnosti, ki so bolj ugodne za predvideno reakcijo. Nadalje lahko uporabimo seve, izvedene iz teh mikroorganizmov z genetskim inženirstvom ali biotehnološkimi postopki, kot npr. rekombinantno DNA tehnologijo ali celično fuzijo. Kot primer za tak mikroorganizem lahko navedemo Escherichia coli HB101 (pNTEGRG) FERM BP-6898 (PCT/JP00/08321), ki ima zasidran reduktazni gen, izveden iz Candida magnoliae IFO 0705.

Za kultivacijo teh mikroorganizmov lahko uporabimo katerikoli hranilni vir, ki ga ti mikroorganizmi lahko na splošno uporabijo. Kot vir ogljika lahko npr. uporabimo saharide, kot npr. glukozo, saharozo, maltozo itd.; organske kisline, kot npr. mlečno kislino, očetno kislino, citronsko kislino, propionsko kislino itd.; alkohole, kot npr. etanol, glicerol itd.; ogljikovodike, vključno parafin; olja, kot npr. sojino olje, repično olje itd.; in njihove zmesi, kot vir dušika pa lahko zmešamo amonijev sulfat, amonijev fosfat, sečnino, ekstrakt kvasovk, mesni ekstrakt, pepton, vodni racemat koruze itd. Nadalje lahko prikladno primešamo tudi anorganske soli, vitamine in druga hranila.

Zgornje mikroorganizme lahko kultiviramo pri konvencionalnih pogojih. Kultiviramo jih npr. aerobno pri pH od 4,0 do 9,5, pri temperaturi v območju od 20 °C do 45 °C od 10 do 96 ur. Da dopustimo mikroorganizmu, da deluje na monoacilni derivat dihidroksioksoheksanojske kisline, navadno lahko uporabimo kulturo zgornjega mikroorganizma kot tako za reakcijo, podobno pa lahko uporabimo tudi koncentrat kulturne brozge. Poleg tega je v nekaterih primerih, kjer nekatere sestavine v kulturni brozgi lahko škodljivo vplivajo na reakcijo, prednostno, da uporabimo celice ali obdelane celice, kot jih dobimo s centrifugiranjem in/ali drugimi obdelavami kulturne brozge.

Obdelane celice, omenjene zgoraj, niso posebno omejene, vendar vključujejo, npr. posušene celice, dobljene z dehidriranjem z acetonom ali difosforjevim pentoksidom ali s sušenjem v sušilniku ali s fenom, celice, obdelane s površinsko aktivnim sredstvom, encimatsko razgrajene celice, imobilizirane celice ali ekstrakt brez celic, ki ga dobimo z razbitjem celic. Nadalje lahko iz kulturne brozge očistimo in uporabimo encim, ki katalizira asimetrično redukcijo.

Pri vodenju redukcijske reakcije lahko substrat monoacilni derivat dihidroksioksoheksanojske kisline dodamo v celoti naenkrat v začetni stopnji reakcije ali pa zaporedno v delih pri nadaljevanju reakcije.

Temperatura med reakcijo je na splošno od 10 do 60 °C, prednostno od 20 do 40 °C, pH med reakcijo pa je od 2,5 do 9, prednostno od 5 do 9.

Koncentracijo mikroorganizma v reakcijski zmesi lahko pravilno izberemo v skladu z njegovo sposobnostjo, da reducira substrat. Koncentracija substrata v reakcijski zmesi je prednostno od 0,01 do 50 % (mas./vol.), bolj prednostno od 0,1 do 30 %.

Reakcijo navadno izvedemo s stresanjem ali mešanjem z aeriranjem. Reakcijski čas pravilno izberemo v skladu s koncentracijo substrata, koncentracijo mikroorganizma in drugimi reakcijskimi pogoji. Na splošno različne pogoje prednostno izberemo tako, da zagotovimo, da je reakcija končana v 2 do 168 urah.

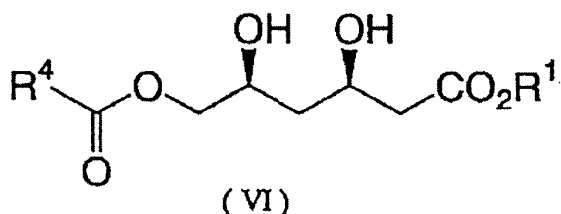
Da pospešimo redukcijsko reakcijo je prednostno, da dodamo energijski vir, kot je npr. glukoza, etanol in/ali podobno, v deležu od 1 do 30 % glede na reakcijsko zmes, da le-to vodi do bolj zadovoljivega rezultata. Reakcijo lahko pospešimo tudi z dodajanjem koencima, kot je npr. reduciran nikotinamid-adenin dinukleotid (NADH) ali reduciran nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat (NADPH), za katerega se na splošno domneva, da je potreben za redukcijske reakcije z biološkimi tehnikami. Bolj posebno lahko le-te dodamo direktno v reakcijsko zmes ali lahko dodamo reakcijski sistem, ki proizvaja NADH ali NADPH, skupaj z oksidiranim koencimom, v

reakcijsko zmes. Izkoristimo lahko npr. reakcijski sistem, ki reducira NAD v NADH, ker formiat dehidrogenaza proizvode ogljikov dioksid in vodo iz mravljinčne kisline, ali reakcijski sistem, ki reducira NAD oz. NADP v NADH oz. NADPH, ker glukoza dehidrogenaza proizvode glukonolakton iz glukoze. Nadalje je tudi učinkovito, da dodamo v reakcijsko zmes površinsko aktivno sredstvo, kot npr. Triton (proizvod od Nakalai Tesque), Span (proizvod od Kanto Chemical) ali Tween (proizvod od Nakalai Tesque). Poleg tega lahko zato, da se izognemo inhibiciji reakcije s substratom in/ali alkoholom, ki je stranski produkt redukcijske reakcije, v reakcijsko zmes dodamo organsko topilo, ki je netopno v vodi, kot npr. etil acetat, butil acetat, izopropil eter, toluen in podobne. Za povečanje topnosti substrata lahko dodamo tudi organsko topilo, ki je topno v vodi, kot npr. metanol, etanol, aceton, tetrahidrofuran, dimetilsulfoksid ali podobne.

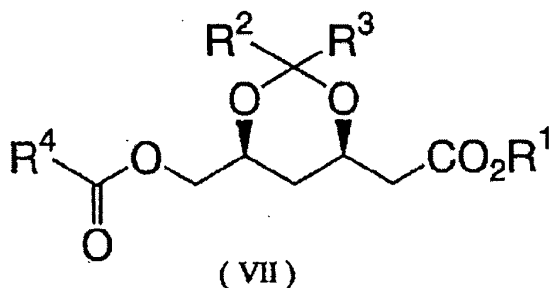
Monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline, proizveden z redukcijsko reakcijo, lahko rekuperiramo direktno iz reakcijske zmesi ali po odstranitvi celic in drugega, ekstrakciji s topilom, kot npr. etil acetatom, toluenom ali podobnim, in kasnejši odstranitvi topila. Poleg tega lahko dobimo monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline z visoko stopnjo čistote s čistilnim postopkom, kot je prekrizalizacija, silikagelna kolonska kromatografija ali podobno.

Stopnja (4)

V tej stopnji (3R,5S)-konfiguriran monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline, prikazan z naslednjo formulo (VI):



kot je dobljen v stopnji (3), obdelamo z reagentom, ki tvori acetal, v navzočnosti kislinskega katalizatorja, da proizvedemo (4R,6S)-konfiguriran derivat aciloksimetildioksanilocetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (VII):

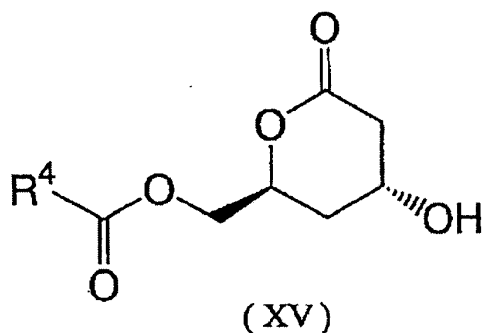


V stopnji (4) reagent, ki tvori acetal, ki ga lahko uporabimo, vključuje npr. keton, aldehyd, alkoksialkan in alkoksialken. Kot specifične primere za keton, aldehyd, alkoksialkan in alkoksialken lahko omenimo npr. aceton, cikloheksanon, formaldehyd, benzaldehyd, dimetoksimetan, 2,2-dimetoksiopropan, 2-metoksipropen in 1,1-dimetoksicikloheksan itd. Prednostni so aceton, 2-metoksipropen, 2,2-dimetoksiopropan itd., bolj prednosten je 2,2-dimetoksiopropan. Nivo uporabe reagenta, ki tvori acetal, glede na monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline je prednostno od 1 do 10 molskih ekvivalentov, bolj prednostno od 1 do 5 molskih ekvivalentov. Za pospešitev reakcije lahko reagent, ki tvori acetal, uporabimo kot reakcijsko topilo.

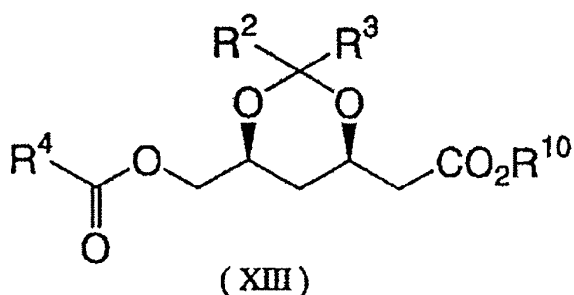
Kislinski katalizator, ki ga lahko uporabimo v stopnji (4), vključuje Lewisove kisline ali Brönstedove kisline. Kot Lewisove kisline in Brönstedove kisline lahko omenimo npr. Lewisove kisline, kot npr. aluminijev triklorid, borov fluorid, cinkov diklorid, kositrov tetraklorid itd.; karboksilne kisline, kot npr. oksalno, mravljinčno, očetno, benzojsko, trifluoroocetno itd.; sulfonske kisline, kot npr. metansulfonsko, benzensulfonsko, p-toluensulfonsko, kafrasulfonsko itd.; in anorganske kisline, kot npr. klorovodikovo, bromovodikovo, žveplovo, dušikovo, borovo kislino itd.

Nivo uporabe kislinskega katalizatorja v stopnji (4) glede na monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline je prednostno od 0,001 do 0,5 molskega ekvivalenta, bolj prednostno od 0,005 do 0,1 molskega ekvivalenta.

Reakcija, ki tvori acetal, z uporabo kislinskega katalizatorja je stranska reakcija, ki vključuje intramolekularne hidroksilne skupine, in je do sedaj otežavala potek zelene reakcije z dobrim učinkom. Glede stranskih reakcij pa pri reakciji ciklizacije, ki vključuje intramolekularne hidroksilne skupine in estrske skupine, nastane npr. aciloksimetilhidroksiaceton, prikazan z naslednjo formulo (XV):



(v formuli je R^4 , kot je definirano pred tem), kot stranski produkt. Kadar uporabimo alkoksialkan ali alkoksialken kot reagent, ki tvori acetal, stranski produkt alkohol reagira z zgornjo spojino (XV), da dobimo analogno spojino (ki ima različno estersko skupino) derivata aciloksimetildioksalil očetne kisline, prikazano z naslednjo formulo (XIII):



(v formuli so R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano pred tem, in R^{10} pomeni nižjo alkilno skupino (prednostno vsebujočo od 1 do 4 atome ogljika), ki je različna od R^1), kot stranski produkt. Kadar uporabimo npr. 2,2-dimetoksipropan kot reagent, ki tvori acetal, stranski produkt metanol sodeluje pri reakciji, da dobimo metil ester aciloksimetildioksalil očetne kisline z zgornjo formulo (XIII), v kateri R^{10} pomeni metilno skupino, kot stranski produkt.

Stranska proizvodnja teh nečistoč zmanjša dobiček in kvaliteto obravnavane spojine - produkta, zato je takrat, kadar je treba voditi reakcijo, ki tvori acetal, z uporabo kislinskega katalizatorja, potrebno natančno izbrati in kontrolirati reakcijske razmere, kot npr. reakcijsko temperaturo, reakcijski čas, količine reagentov itd.

Izumitelji predloženega izuma smo razvili potek za vodenje reakcije, ki tvori acetal, v navzočnosti aminske soli, sestavljene iz kisline in amina, kot katalizatorja, pri čemer lahko tvorbo nečistoč (XIII) in (XV) in različnih drugih stranskih nečistoč v sledovih, ki niso bile strukturno potrjene, zatremo do minimuma, ne da bi zmanjšali dobiček. Kot kislino lahko uporabimo katerokoli od kislin, navedenih pred tem, prednostne pa vključujejo klorovodikovo, bromovodikovo, žveplovo, trifluoroocetno, metansulfonsko, benzensulfonsko in p-toluensulfonsko kislino. Nivo uporabe kisline glede na monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline je prednostno od 0,001 do 0,5 molskega ekvivalenta, bolj prednostno od 0,005 do 0,1 molskega ekvivalenta.

Amin vključuje amoniak, primarne amine, kot npr. metilamin, etilamin, butilamin, anilin itd.; sekundarne amine, kot npr. dietilamin, diizopropilamin, difenilamin, piperidin, morfolin itd.; in terciarne amine, kot npr. trietilamin, tributilamin, diizopropiletilamin, N-metilmorfolin, N-metilpiperidin, piridin, 2-metilpiridin, 3-metilpiridin, imidazol, N,N-dimetilaminopiridin, 1,7-diazabicyklo[5,4,0]-undec-7-en, itd. Prednostni so terciarni amini, pri čemer je bolj prednosten trietilamin, N-metilmorfolin, diizopropiletilamin, piridin, 2-metilpiridin, 3-metilpiridin ali imidazol. Nivo uporabe amina glede na kislino je prednostno od 1 do 10 molskih ekvivalentov, bolj prednostno od 1 do 3 molske ekvivalenti.

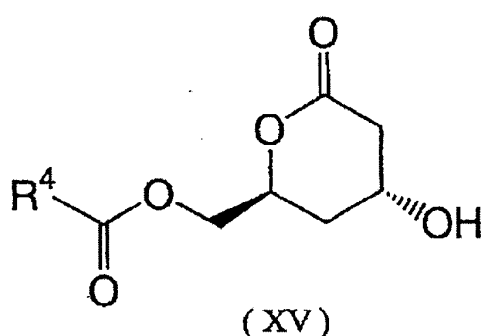
To reakcijo lahko izvedemo z uporabo aminske soli kot katalizatorja, pripravljene iz kisline in amina, in izolirane vnaprej. Aminska sol vključuje npr. piridinijev hidroklorid, piridinijev hidrobromid, piridinijev sulfat, piridinijev trifluoroacetat, piridinijev metansulfonat, piridinijev p-toluensulfonat, trietilamonijev hidroklorid, trietilamonijev sulfat, 3-metilpiridinijev p-toluensulfonat, N-metilmorfolin p-toluensulfonatno sol, N,N-dimetilaminopiridinijev benzensulfonat, diizopropilamonijev hidroklorid, amonijev hidroklorid, amonijev sulfat, amonijev nitrat in amonijev metil p-toluensulfonat. Prednosten je piridinijev p-toluensulfonat ali trietilamonijev p-toluensulfonat. Nivo uporabe aminske soli glede na monoacilni derivat trihidroksiheksanojske kisline je prednostno od 0,001 do 0,5 molskega ekvivalenta, bolj prednostno od 0,005 do 0,1 molskega ekvivalenta.

Za vodenje reakcije v skladu s stopnjo (4) lahko uporabimo različna organska topila kot reakcijsko topilo. Kot taka organska topila lahko omenimo npr. ogljikovodikovo topilo, kot npr. benzen, toluen, cikloheksan, itd.; etrska topila, kot npr. dietileter, tetrahidrofuran, 1,4-dioksan, metil t-butil eter, dimetoksietan, itd.; esterska topila, kot npr. etil acetat, butil acetat itd.; ketonska topila, kot npr. aceton, metil etil keton itd.; halogenirana ogljikovodikova topila, kot npr. metilenklorid, kloroform, 1,1,1-trikloroetan, itd.; topila, ki vsebujejo dušik, kot npr. N,N-dimetilformamid, acetamid, formamid, acetonitril, itd.; in aprotična polarna topila, kot npr. dimetilsulfoksid, N-metilpirolidon, heksametilfosforjev triamid itd. Ta organska topila lahko uporabimo vsakega neodvisno ali lahko uporabimo dva ali več od njih v kombinaciji. Prednostni so toluen, aceton, etilacetat, metilenklorid, tetrahidrofuran, metil terc.-butil eter, dimetilformamid in acetonitril, pri čemer je aceton bolj prednosten. Reakcijska temperatura v stopnji (4) je od -20 °C do 100 °C, prednostno od 0 °C do 50 °C.

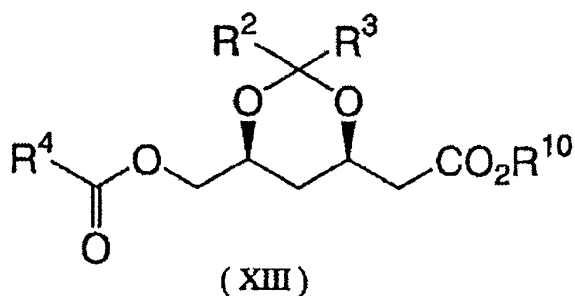
Kasnejšo obdelavo po stopnji (4) lahko izvedemo z rutinsko kasnejšo obdelavo za rekuperiranje produkta iz reakcijske zmesi. Vodo dodamo npr. v reakcijsko zmes po dokončani reakciji in ekstrakcijo izvedemo z navadnim topilom za ekstrakcijo, npr. etilacetatom, dietiletrom, metilenkloridom, toluenom ali heksanom. Iz tako dobljenega

ekstrakta odstranimo reakcijsko topilo in topilo za ekstrakcijo s segrevanjem pri znižanem tlaku ali s podobnim postopkom, da dobimo obravnavano spojino.

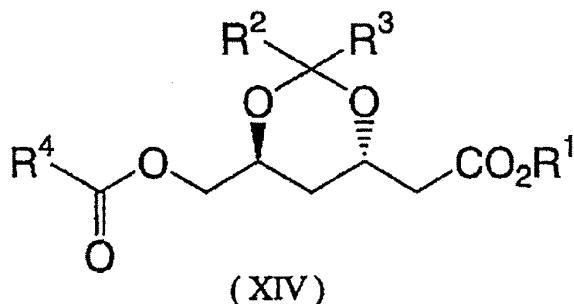
Tako dobljena obravnavana spojina je ima težnjo, da vsebuje različne nečistoče, ki izvirajo iz različnih razgradenj in stranskih reakcij, ki potekajo med proizvodnjo. Posebno ima težnjo, da vsebuje vsaj enega člana skupine, ki jo sestavljajo aciloksihidroksilakton, prikazan z naslednjo splošno formulo (XV):



(v formuli je R^4 , kot je definirano zgoraj), analogna spojina (z različno estrsko skupino) derivata aciloksimetildioksalilacetne kisline, prikazana z naslednjo splošno formulo (XIII):



(v formuli so R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, R^{10} pomeni nižjo alkilno skupino, ki je različna od R^1), diastereomer, prikazan z naslednjo formulo (XIV):



(v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj), in reakcijski substrat, prikazan s formulo (VI), in zato da dobimo obravnavano spojino visoke kvalitete, je treba te nečistoče odstraniti. Na splošno pa ni enostavno odstraniti kakršnihkoli nečistoč, ki so strukturno podobne obravnavani spojini (strukturni analog), in zato da lahko take nečistoče odstranimo, da dobimo obravnavano spojino visoke kvalitete, je potreben učinkovit čistilni/izolacijski postopek. Izumitelji predloženega izuma smo ugotovili, da lahko te nečistoče učinkovito odstranimo z izvajanjem kristalizacije pri pogojih, opisanih spodaj.

Kristalizacijsko topilo za uporabo v predloženem izumu je prednostno alifatsko ogljikovodikovo topilo. Bolj podrobno lahko omenimo npr. alifatske ogljikovodike s 5 do 20 atomi ogljika, kot npr. pentan, petroleter, neopentan, heksan, cikloheksan, metilcikloheksan, heptan, cikloheptan, oktan, izooktan, nonan, dekan, undekan, dodekan itd. Med temi so prednostni pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan in izooktan. Le-te lahko uporabimo vsakega neodvisno ali v kombinaciji dveh ali več vrst.

Posebno pa je v zvezi z odstranitvijo topila iz mokrih kristalov s sušenjem ali rekuperiranjem in ponovno uporabo topila (destilativno rekuperiranje) prednostno, da uporabimo topila, ki imajo primerljivo nizko vrelišče. Kot taka topila lahko na splošno omenimo topila, ki imajo vrelišče, ki ni višje od pribl. 100 °C pri atmosferskem ali podatmosferskem tlaku. Bolj posebno lahko npr. omenimo alifatska ogljikovodikova topila s 5 do 8 atomi ogljika, kot npr. pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan,

izooktan itd., kadar pa upoštevamo stroške za topilo, enostavnost ravnanja in druge faktorje, sta bolj prednostna heksan in metilcikloheksan.

Uporaba zgornjih alifatskih ogljikovodikovih topil zagotavlja stabilizacijo in gotovost visokega dobitka zgornje spojine kot tudi visoko stopnjo čiščenja, to pomeni učinkovito odstranitev raznih nečistoč, posebno spojin (XIII), (XIV), (XV) in (VI). Nivo uporabe alifatskega ogljikovodikovega topila je prednostno tak, da produkt, ki ga lahko dobimo po končani kristalizacije spojine (VII), ohrani zadostno fluidnost, in sme biti npr. pribl. 5 do 20 masnih delov ali v nekaterih primerih celo več, glede na spojino (VII).

Za kristalizacijo spojine (VII) v smislu izuma lahko uporabimo kristalizacijo s hlajenjem, kristalizacijo s koncentracijo in druge postopke za kristalizacijo, vsakega neodvisno ali v kombinaciji. Kristalizacija s koncentracijo, navedena zgoraj, je lahko kristalizacijski postopek pri katerem raztopino, sestavljeno iz topila, ki je drugačno od alifatskega ogljikovodikovega topila, pretvorimo v raztopino, sestavljeno iz alifatskega ogljikovodikovega topila. Poleg tega lahko dodamo cepilne kristale pri tej kristalizaciji.

V predloženem izumu lahko za izboljšanje vsaj enega parametra izmed topnosti, dobitka, obdelovalne koncentracije, čistilnega učinka (učinek odstranitve nečistoč) in fizikalnih lastnosti kristalov zgornje spojine (VII), ki jih lahko dobimo, uporabimo pomožno topilo poleg alifatskega ogljikovodikovega topila pri vodenju kristalizacije. Pomožno topilo lahko dodamo v alifatsko ogljikovodikovo topilo, kot je potrebno, ali lahko spojino (VII) raztopimo v pomožnem topilu vnaprej in dodamo raztopino v alifatsko ogljikovodikovo topilo.

Pomožno topilo, omenjeno zgoraj, ni posebno omejeno in vključuje npr. aceton, metil etil keton, tetrahidrofuran, metil terc.-butil eter, etil acetat, izopropanol, terc.-butil acetat, etanol, izopropil alkohol, toluen, benzen, ksilen, klorobenzen, metilen klorid, kloroform in 1,2-dikloroetan itd. Le-ta lahko uporabimo vsakega neodvisno ali v

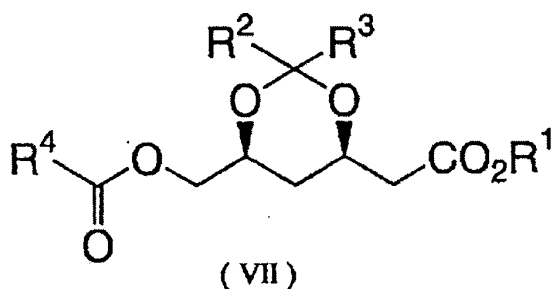
kombinaciji dveh ali več vrst. Med temi prispevajo etilacetat, toluen, metil terc.-butileter, metilen klorid, itd. k povečani topnosti in izboljšanim obdelovalnim učinkom, kot je npr. obdelovalna koncentracija in čistilni učinek.

Pomožno topilo, omenjeno zgoraj, bolj izrazito učinkuje, kadar ga uporabimo v prikladni količini v kombinaciji z alifatskim ogljikovodikovim topilom, pri čemer je ta prikladna količina določena v skladu z lastnostmi pomožnega topila v povezavi z zelenim učinkom in drugimi faktorji. Optimalni nivo uporabe pomožnega topila lahko ugotovimo z enostavnim eksperimentiranjem. S stališča dobitka in čistilnega učinka je nivo uporabe zgornjega pomožnega topila prednostno tak, da masno razmerje pomožnega topila in alifatskega ogljikovodikovega topila (pomožno topilo/alifatsko ogljikovodikovo topilo) ni večje od 1 po dokončanem postopku kristalizacije spojine (VII). Bolj prednostni nivo je tisti, pri katerem je razmerje 0,5 ali manjše.

Čistilni/izolacijski postopek v smislu predloženega izuma lahko izvedemo pri pribl. sobni temperaturi. Kjer je potrebno, lahko postopek izvedemo s segrevanjem ali ohlajevanjem, npr. pri temperaturi, ki ni višja od pribl. 60 °C, navadno pri 50 °C do -30 °C.

Tako dobljeno zgornjo spojino (VII) lahko ločimo s tehniko za ločevanje trdne snovi in tekočine, po izbiri pa temu sledi izpiranje kolača in sušenje. Zgornja tehnika za ločevanje trdne snovi in tekočine ni posebno omejena in vključuje npr. filtracijo pod tlakom, sesalno filtracijo, centrifugiranje itd. Zgoraj omenjeno sušenje prednostno izvedemo pri znižanem tlaku (sušenje v vakuumu) pri temperaturi, ki ni višja od pribl. 60 °C, zato da se izognemo pirolizi ali fuziji.

V derivatu aciloksimetildioksanil očetne kisline z naslednjo formulo (VII):

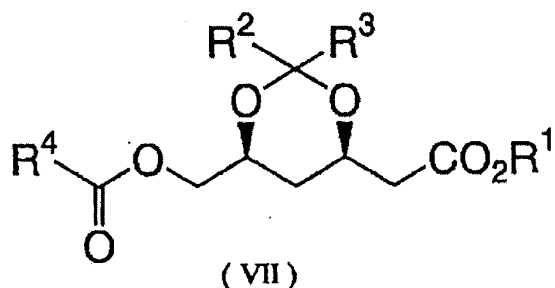


kot ga dobimo v stopnji (4), R^2 in R^3 vsak neodvisno pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika. Bolj podrobno lahko omenimo metilno, etilno, terc.-butilno, heksilno, fenilno, benzilno, p-metoksibenzilno in podobne skupine. Prednostna je metilna skupina.

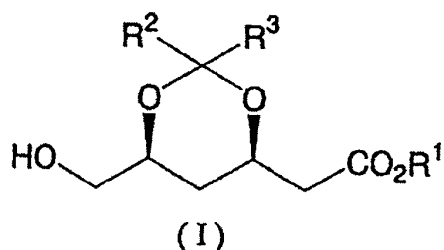
Poleg tega lahko R^2 in R^3 skupaj tvorita obroč. R^2 in R^3 lahko npr. tvorita ciklopentanski, cikloheksanski, cikloheptanski, benzociklopentanski obroč ali podobne, da tako tvorita spiro strukturo z 1,3-dioksanskim obročem.

Stopnja (5)

V tej stopnji (4R,6S)-konfiguriran derivat aciloksimetildioksanilocetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (VII):



kot ga dobimo v stopnji (4), izpostavimo solvolizi v navzočnosti baze po znanem postopku ali podobnem, da dobimo (4R,6S)-konfiguriran derivat hidroksimetildioksanilocetne kisline s splošno formulo (I):



Baza, ki jo lahko uporabimo za solvolizo v stopnji (5), vključuje anorganske in organske baze, kot npr. natrijev karbonat, kalijev karbonat, natrijev hidrogeenkarbonat, kalijev hidrogenkarbonat, natrijev hidroksid, kalijev hidroksid, kalcijev hidroksid, litijev hidroksid, barijev hidroksid, magnezijev hidroksid, natrijev acetat, kalijev acetat, amoniak, trietilamin, piridin, piperidin, N,N-dimetilaminopiridin, itd. Prednosten je kalijev karbonat.

Nivo uporabe baze v tej stopnji glede na derivat aciloksimetildioksanilocetne kisline je od 0,001 do 5 ekvivalentov, prednostno od 0,01 do 1,0 ekvivalenta.

V stopnji (5) za izvedbo solvolize reakcijo izvajamo v vodi ali protičnem organskem topilu ali v zmesi vode ali protičnega organskega topila in aprotičnega organskega topila. Protično organsko topilo, omenjeno zgoraj, vključuje npr. alkoholna topila, kot npr. metanol, etanol, butanol, izopropil alkohol, etilen glikol, metoksietanol itd. in aminska topila, kot npr. dietilamin, pirolidin, piperidin itd. Aprotično organsko topilo, omenjeno zgoraj, vključuje npr. ogljikovodikova topila, kot npr. benzen, toluen, cikloheksan itd.; etrska topila, kot npr. dietil eter, tetrahidrofuran, 1,4-dioksan, metil t-butil eter, dimetoksietan itd.; estrska topila, kot npr. etil acetat, butil acetat itd.; ketonska topila, kot npr. aceton, metiletilketon itd.; halogenirana ogljikovodikova topila, kot npr. metilenklorid, kloroform, 1,1,1-trikloroetan itd.; topila, ki vsebujejo dušik, kot npr. N,N-dimetilformamid, acetonitril itd.; in aprotična polarna topila, kot

npr. dimetilsulfoksid, N-metilpirolidon, heksametilfosforjev triamid itd. Prednostni so voda, metanol in etanol.

Reakcijska temperatura za stopnjo (5) je $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, prednostno $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kasnejša obdelava, ki sledi po dokončani reakciji, je lahko tista, ki jo na splošno izvedemo za rekuperiranje produkta iz reakcijske zmesi. Reakcijsko zmes, ki je na voljo po dokončani reakciji, lahko npr. dodamo z vodo in ekstrahiramo z navadnim topilom za ekstrakcijo, kot je npr. etil acetat, dietil eter, metilen klorid, toluen, heksan ali podobno. Iz tako dobljenega ekstrakta odstranimo reakcijsko topilo in topilo za ekstrakcijo s segrevanjem pri znižanem tlaku ali s podobnim postopkom, ..a izoliramo obravnavano spojino. Alternativno lahko po dokončani reakciji reakcijsko topilo takoj oddestiliramo s segrevanjem pri znižanem tlaku ali s podobnim postopkom in nato izvedemo enak postopek kot zgoraj. Obravnavani produkt, ki ga tako dobimo, lahko očistimo še do višje čistote z rutinskim postopkom, kot je npr. čiščenje s kristalizacijo, frakcionirno destilacijo, kolonsko kromatografijo in/ali podobno.

Spodnji Primeri so namenjeni za nadaljnjo podrobnejšo ponazoritev predloženega izuma, ne da bi definirali obseg izuma.

Primer 1 terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V 21,3 ml (35 mmol) raztopine n-butillitija v heksanu (1,5 mol/l) dodamo raztopino diizopropilamina (3,54 g, 35 mmol) - tetrahidrofurana (10 ml) po kapljicah ob mešanju pri $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in zmes mešamo pod argonom 1 uro, da pripravimo raztopino litijevega diizopropilamida. Potem ko to raztopino ohladimo na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, dodamo po kapljicah 4,06 g (35 mmol) terc.-butil acetata in zmes mešamo pri enaki temperaturi 1 uro. Nato dodamo 1 ml raztopine (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona (1,02 g, 10 mmol) v THF po kapljicah in celotno zmes mešamo pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 uri, po tem času pa temperaturo povišamo na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. V ločeni posodi zmešamo 60 ml 1 N-klorovodikove

kislina in 60 ml dietiletra v zmes in vanjo zlijemo zgornjo reakcijsko zmes. Vodni fazi naravnamo pH na 6,5 z 1N-klorovodikovo kislino, nato jo pustimo, da stoji, nato pa ločimo organsko plast. Vodno plast nadalje ekstrahiramo s 3 deli etilacetata, vsakim po 50 ml, in organske plasti zberemo in dehidratiramo nad brezvodnim magnezijevim sulfatom. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku in ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60, proizvod od Mercka; heksan : etil acetat = 2 : 1).

S tem postopkom dobimo 1,56 g terc.-butil estra (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline (rumeno olje). Dobitek: 71 %.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz/ppm); 1,48 (9H, s), 2,68-2,83 (2H, m), 3,05-3,80 (2H, bs), 3,42 (2H, s), 4,02-4,17 (2H, m), 4,40 (1H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz/ppm); 27,8, 45,7, 51,0, 65,6, 68,0, 82,3, 166, ., 203,4.

IR (čisto); 3425, 3000, 1710, 850 cm⁻¹

[α]_D²⁰ = -17,25 (c=2,14, MeOH).

Primer 2 terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V 30 ml (45 mmol) raztopine n-butillitija v heksanu (1,5 mol/l) dodamo po kapljicah ob mešanju pri 5 °C raztopino diizopropilamina (5,01 g, 49,5 mmol) - tetrahidrofurana (5 ml) in zmes mešamo pod argonom 1 uro, da pripravimo raztopino litijevega diizopropilamida. V ločeni posodi raztopimo 1,02 g (10 mmol) (S)-β-hidroksi-γ-butirolaktona in 2,32 g (20 mmol) terc.-butil acetata v 8,0 ml tetrahidrofurana in zmes mešamo pod argonom pri 0 do 5 °C. V to raztopino dodamo po kapljicah v 30 minutah raztopino litijevega diizopropilamida, pripravljeno zgoraj, in zmes nadalje mešamo pri 5 do 20 °C 16 ur. V ločeni posodi zmešamo 35 ml 3N-klorovodikove kisline in 30 ml etil acetata v zmes in vanjo zlijemo zgornjo reakcijsko zmes. To pustimo, da stoji, nato organsko plast odvezamo, speremo z nasičeno vodno raztopino natrijevega klorida in dehidratiramo nad brezvodnim magnezijevim sulfatom. Topilo nato oddestiliramo pod znižanim tlakom in ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60, proizvod od Mercka; heksan : etil acetat = 2 : 1), da dobimo 124 mg

terc.-butil estra (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline (rumeno olje). Dobitek 6 %.

Primer 3 terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V 22,9 ml (35 mmol) raztopine n-butillitija v heksanu (1,5 mol/l) dodamo po kapljicah ob mešanju pri 5 °C raztopino diizopropilamina (3,90 g, 38,5 mmol) - tetrahidrofurana (3 ml) in zmes mešamo pod argonom 1 uro, da pripravimo raztopino litijevega diizopropilamida. V ločeni posodi raztopimo 1,02 g (10 mmol) (S)-β-hidroksi-γ-butirolaktona in 2,32 g (20 mmol) terc.-butil acetata v 3,0 ml tetrahidrofurana in zmes mešamo pod argonom pri 0 do 5 °C. V to raztopino dodamo po kapljicah v 10 minutah 5,7 g (10 mmol) raztopine (1,75 mol/kg) terc.-butilmagnezijevega klorida v toluenu/tetrahidrofuranu (1:2,5 masno razmerje) in zmes nadalje mešamo pri 5 °C 50 minut. V to zmes dodamo po kapljicah v 30 minutah zgoraj pripravljeno raztopino litijevega diizopropilamida, nato pa to mešamo 16 ur pri 5 do 20 °C.

V ločeni posodi zmešamo 30 ml 3N-klorovodikove kisline in 30 ml etil acetata v zmes in vanjo zlijemo zgornjo reakcijsko zmes. To pustimo, da stoji, nato organsko plast odvezamo, speremo z nasičeno vodno raztopino natrijevega klorida in dehidriramo nad brezvodnim magnezijevim sulfatom. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku in ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60, proizvod od Mercka; heksan : etil acetat = 2 : 1), da dobimo 980 mg terc.-butil estra (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline (rdeče olje). Dobitek 48 %.

Primer 4 terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V suspenzijo 9,82 g (150 mmol) cinkovega prahu v 40 ml tetrahidrofurana dodamo 1,9 ml (15 mmol) trimetilsililklorida pri sobni temperaturi in zmes mešamo 30 minut. V to zmes dodamo 2,4 ml (10,5 mmol) terc.-butil α-bromoacetata in 4,27 g (42 mmol) (S)-β-hidroksi-γ-butirolaktona in temperaturo povišamo na 65 °C. Pri enaki temperaturi nadalje postopno dodamo v 30 minutah 15,3 ml (94,5 mmol) terc.-butil-α-

bromoacetata. Po končanem dodajanju zmes nadalje mešamo pri 65 °C 30 minut in po tem času reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in razredčimo s 50 ml vode. Reakcijski zmesi nato naravnamo pH na 6,8 z 20 % vodno raztopino NaOH in oborjeno trdno snov odfiltriramo. Filtrat ekstrahiramo s 3 deli etil acetata, vsakim po 100 ml, in organske plasti združimo in dehidratiramo nad brezvodnim natrijevim sulfatom. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo rumeno olje. Ta ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60, proizvod od Mercka; heksan : aceton = 5 : 1), da dobimo 2,66 g terc.-butil estra (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline (rumeno olje). Dobitek 29 %.

Primer 5 terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V raztopino 16,8 g (77 mmol) terc.-butil estra (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline, pripravljenega v Primeru 1, v 120 ml metilen klorida dodamo 11,2 ml piridina in 10,2 ml benzoil klorida pri 0 °C in zmes mešamo pri 0 °C 2 uri. Po končani reakciji reakcijsko zmes razredčimo z 38 ml vode in naravnamo pH na 7 z 20 % vodno raztopino NaOH. Vodno plast ločimo in nadalje ekstrahiramo z 2 deloma metilen klorida, vsakim po 120 ml. Organske plasti združimo in dehidratiramo nad brezvodnim natrijevim sulfatom in topilo oddestiliramo pod znižanim tlakom, da dobimo olje. Ta ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60, proizvod od Mercka; heksan : aceton = 5 : 1), da dobimo 19,3 g terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline (bela trdna snov). Dobitek 78 %.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz/ppm); 1,46 (9H, s), 2,85 (2H, d), 3,09 (1H, d), 3,42 (2H, s), 4,36 (2H, m), 4,50 (1H, m), 7,45 (2H, dd), 7,56 (1H, dd), 8,05 (2H, d).

IR (KBr); 3495, 1730, 1700, 1335, 1290, 1150, 720 cm⁻¹, tal.: od 67 do 68 °C.

Primer 6 terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V 109 ml (175 mmol) raztopine n-butillitija v heksanu (1,5 mol/l) dodamo po kapljicah ob mešanju pri 5 °C raztopino diizopropilamina (19,48 g, 195 mmol) - tetrahidrofurana (30 ml) in zmes mešamo pod argonom 1 uro, da pripravimo raztopino

litijevega diizopropilamida. V ločeni posodi raztopimo 5,10 g (50 mmol) (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona in 14,5 g (125 mmol) terc.-butil acetata v 60 ml tetrahidrofurana in raztopino mešamo pod argonom pri 0 do 5 °C. V to raztopino dodamo po kapljicah v 30 minutah 27,8 g (50 mmol) mešane raztopine terc.-butil magnezijevega klorida v toluenu/tetrahidrofuranu (1 : 2,5 masno razmerje) (1,8 mol/kg) in zmes nadalje mešamo pri 5 °C 30 minut. V to zmes dodamo zgoraj pripravljeno raztopino litijevega diizopropilamida po kapljicah v 3 urah in zmes nadalje mešamo pri 5 do 20 °C 16 ur. V ločeni posodi zmešamo 25,05 g očetne kisline, 75 ml vode in 150 ml etil acetata v zmes in vanjo zlijemo zgornjo reakcijsko zmes. To pustimo da to stoji, vodno plast ločimo in nadalje ekstrahiramo z 2 deloma etil acetata, vsakim po 150 ml. Organske plasti združimo, razredčimo z 20 ml nasičene vodne raztopine natrijevega klorida in naravnamo pH na 3 s 3N-klorovodikovo kislino. Potem ko vodno plast ločimo, organsko plast nadalje speremo z 20 ml nasičene vodne raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in dehidratiramo nad brezvodnim magnezijevim sulfatom. Topilo oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 18,18 g rumenega olja, ki vsebuje terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline.

V zgornje olje dodamo 6,32 g (80 mmol) piridina in 50 ml toluena in zmes ohladimo na 5 °C. V to zmes dodamo 6,32 g (45 mmol) benzoil klorida in celotno zmes mešamo pri 5 °C 1,5 ure. Nato dodamo 25 ml vode in 15 ml 3N-klorovodikove kisline. To zmes ekstrahiramo s 100 ml etil acetata in organsko plast speremo s 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 50 ml vode, 2-krat. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 18,43 g rumenega olja. To olje analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetronitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C). Iz analize je razvidno, da je reakcijski dobitok terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline 55 %.

Primer 7 terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V 125 ml (225 mmol) raztopine n-butilmagnezijskega klorida v tetrahidrofuranu (1,8 mol/l) dodamo po kapljicah ob mešanju pri 40 °C 25,04 g (247,5 mmol) diizopropilamina in zmes nadalje mešamo pod argonom pri 40 °C 2 uri, da pripravimo belo brozgo kloromagnezijskega diizopropilamida. V ločeni posodi raztopimo 5,10 g (50 mmol) (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona in 1,45 g (125 mmol) terc.-butil acetata v 30 ml dimetoksi etana in raztopino mešamo pri 0 do 5 °C pod argonom. V to raztopino dodamo zgoraj pripravljeno brozgo kloromagnezijskega diizopropilamida po kapljicah v 3 urah in zmes nadalje mešamo pri 5 do 20 °C 16 ur.

V ločeni posodi zmešamo 28,4 g očetne kisline, 100 ml vode in 150 ml etil acetata v zmes in vanjo zlijemo zgornjo reakcijsko zmes. To pustimo, da stoji, nato vodno plast ločimo in nadalje ekstrahiramo z 2 deloma etil acetata, vsakim po 150 ml. Organske plasti združimo, razredčimo z 20 ml nasičene vodne raztopine natrijevega klorida, naravnamo pH na 3 s 3N-klorovodikovo kislino in vodno plast ločimo. Organsko plast nadalje speremo z 20 ml nasičene vodne raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in dehidratiramo nad brezvodnim magnezijevim sulfatom in topilo oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 14,24 g rdečega olja, ki vsebuje terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline. V zgornje olje dodamo 6,32 g (80 mmol) piridina in 50 ml toluena in zmes ohladimo na 5 °C. V zmes dodamo 5,62 g (40 mmol) benzoilklorida in celotno zmes mešamo pri 5 °C 1 uro. Nato dodamo 25 ml vode in 15 ml 3N-klorovodikove kisline. To zmes ekstrahiramo s 150 ml etil acetata in organsko plast speremo s 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 30 ml vode 2-krat. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 18,12 g rumenega olja. To olje analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C). Kot rezultat ugotovimo, da je reakcijski dobiček za terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline 53 %.

Primer 8 terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline

V 141 ml (225 mmol) raztopine n-butillitija v heksanu (1,6 mol/l) dodamo po kapljicah ob mešanju pri 5 °C raztopino diizopropilamina (25,04 g, 247,5 mmol) - tetrahidrofurana (30 ml) in zmes mešamo pod argonom 1 uro, da pripravimo raztopino litijevega diizopropil amida. V ločeni posodi raztopimo 5,10 g (50 mmol) (S)-β-hidroksi-γ-butirolaktona, 14,5 g (125 mmol) terc.-butil acetata in 9,52 g (100 mmol) brezvodnega magnezijevega klorida v 30 ml tetrahidrofurana in raztopino mešamo pod argonom pri 0 do 5 °C. V to raztopino dodamo po kapljicah v 3 urah zgoraj pripravljeno raztopino litijevega diizopropilamida in zmes nadalje mešamo pri 5 do 20 °C 16 ur. V ločeni posodi zmešamo 28,4 g očetne kisline, 100 ml vode in 150 ml etil acetata v zmes in vanjo zlijemo zgornjo reakcijsko zmes. To pustimo, da stoji, nato vodno plast ločimo in nadalje ekstrahiramo z 2 deloma etil acetata, vsakim po 150 ml. Organske plasti združimo, razredčimo z 20 ml nasičene vodne raztopine natrijevega klorida, naravnamo pH na 3 s 3N-klorovodikovo kislino in vodno plast ločimo. Organsko plast nadalje speremo z 20 ml nasičene vodne raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in dehidratiramo nad brezvodnim magnezijevim sulfatom in topilo oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 12,74 g rdečega olja, ki vsebuje terc.-butil ester (5S)-5,6-dihidroksi-3-oksoheksanojske kisline.

V zgornje olje dodamo 6,32 g (80 mmol) piridina in 50 ml toluena in zmes ohladimo na 5 °C. V to zmes dodamo 5,62 g (40 mmol) benzoil klorida in celotno zmes mešamo pri 5 °C 1 uro. Nato dodamo 25 ml vode in 15 ml 3N-klorovodikove kisline. Zmes ekstrahiramo s 150 ml etil acetata in organsko plast speremo s 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 30 ml vode, 2-krat. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 17,92 g rdečega olja. To olje analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C). Kot rezultat ugotovimo, da je reakcijski dobiček za terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline 55 %.

Primer 9 Čiščenje terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline

Olje, ki vsebuje terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline, kot je pripravljen v Primeru 6, analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (razmerja so opisana v Primeru 6). Čistota: 48,2 mas.% (58,1 area %). Kot nečistočo olje vsebuje 4,8 mas.% (6,5 area %) terc.-butil ester (5S)-5,6-dibenziloksi-3-oksoheksanojske kisline. V 18,43 g tega olja (terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline: 8,88 g) dodamo 30 ml toluena, da naredimo homogeno raztopino, nato pa dodamo 80 ml heksana in zmes ohladimo na 5 °C (obdelovalna koncentracija: 8 % (masa substrata/volumen raztopine)). V to motno raztopino dodamo približno 10 mg cepilnih kristalov in zmes nadalje temeljito mešamo pri enaki temperaturi 1 uro. Dobljene kristalne zberemo s sesalno filtracijo, temeljito osušimo, speremo s 50 ml heksana in posušimo v vakuumu (pribl. $1,33 \cdot 10^2 - 6,65 \cdot 10^2$ Pa, 20 do 40 °C, 2 uri), pri čemer dobimo 6,12 g terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline kot kristale (kristalizacijski rekuperacijski delež je 67 %). Analiza: čistota 97,7 mas.% (95,4 area %); vsebnost terc.-butil estra (5S)-5,6-dibenziloksi-3-oksoheksanojske kisline: 0,7 mas.% (0,7 area %).

Primer 10 Čiščenje terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline

Olje, ki vsebuje terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline, kot je pripravljen v Primeru 7, analiziramo s kolonsko kromatografijo visoke ločljivosti (razmerja so opisana v Primeru 6). Čistota je 45,0 mas.% (47,2 area %) in vsebnost nečistoče terc.-butil estra (5S)-5,6-dibenziloksi-3-oksoheksanojske kisline je 4,7 mas.% (4,9 area %). V 18,12 g tega olja (terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline: 8,15 g) dodamo 20 ml toluena, da pripravimo homogeno raztopino. V to raztopino dodamo 80 ml heksana in zmes ohladimo na -30

°C (obdelovalna koncentracija : 8 % (masa substrata/volumen raztopine)). V dobljeno motno raztopino dodamo približno 10 mg cepilnih kristalov in zmes temeljito mešamo pri enaki temperaturi 1 uro. Kristale, ki se izločijo, zberemo s sesalno filtracijo, temeljito posušimo in speremo s 50 ml heksana. Ta pridelek kristalov posušimo v vakuumu (pribl. $1,33 \cdot 10^2$ - $6,65 \cdot 10^2$ Pa, 20 do 40 °C, 2 uri), da dobimo 6,68 g kristalov terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline (kristalizacijski rekuperacijski delež je 77 %). Iz analize kristalov je razvidna čistota 95,8 mas.% (94,9 area %) in vsebnost terc.-butil estra (5S)-5,6-dibenziloksi-3-oksoheksanojske kisline 1,6 mas.% (1,6 area %).

Primer 11 terc.-butil ester (3R,5S)-6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline

V veliko preskusno cev damo 5 ml medija A, opisanega pred tem, in po sterilizaciji inokuliramo z enim izmed mikroorganizmov, navedenih v tabelah 1 in 2. Aerobno kultiviranje s stresanjem izvajamo pri 27 °C 2 do 3 dni. Iz 1,5 ml dela dobljene kulture zberemo celice s centrifugiranjem in jih suspendiramo v 0,5 ml 100 mM fosfatnega pufra (pH 6,5), ki vsebuje 0,05 % terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline in 8 % glukoze. Suspenzijo damo v preskusno cev, opremljeno z zamaškom z navojem, in reakcijo izvajamo s stresanjem pri 27 °C 20 ur. Po reakciji dodamo 4 volumne etil acetata v reakcijsko zmes in po temeljitem mešanju celice odstranimo s centrifugiranjem. Supernatant analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti za količino terc.-butil estra (3R,5S)-6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedeno na 1 ml reakcijske zmesi, in diastereomerno razmerje (razmerje (3R,5S)/(3S,5S)). Rezultati so prikazani v tabelah 1 in 2.

Tabela 1

Mikroorganizem			Dobitek (µg/ml)	D. E. (%)
<u>Ashbya</u>	<u>gossypii</u>	IFO 0560	500.0	61.1
<u>Botryoaescus</u>	<u>synnaedendus</u>	IFO 1604	330.6	63.7
<u>Brettanomyces</u>	<u>custersianus</u>	IFO 1585	59.7	95.1
<u>Candida</u>	<u>arborea</u>	IAM 4147	77.3	72.4
<u>Candida</u>	<u>catenulata</u>	IFO 0745	46.5	10.1
<u>Candida</u>	<u>fennica</u>	CBS 6028	135.1	87.8
<u>Candida</u>	<u>galacta</u>	IFO 10031	121.0	84.3
<u>Candida</u>	<u>haemulonii</u>	IFO 10001	133.7	94.3
<u>Candida</u>	<u>magnoliae</u>	IFO 0705	175.0	27.1
<u>Candida</u>	<u>musae</u>	IFO 1582	39.8	33.5
<u>Candida</u>	<u>nitratophila</u>	IFO 10004	20.1	48.3
<u>Candida</u>	<u>parapsilosis</u>	IFO 0585	118.4	65.7
<u>Candida</u>	<u>pararugosa</u>	IFO 0966	26.6	56.0
<u>Candida</u>	<u>stellata</u>	IFO 0701	27.4	100.0
<u>Citeromyces</u>	<u>matritensis</u>	IFO 0651	446.9	26.2
<u>Clavispora</u>	<u>lusitaniae</u>	IFO 1019	347.1	53.7
<u>Cryptococcus</u>	<u>laurentii</u>	IFO 0609	3.5	14.5
<u>Debaryomyces</u>	<u>carsonii</u>	IFO 0795	449.1	97.3
<u>Debaryomyces</u>	<u>hansenii var. fabryi</u>	IFO 0794	55.4	78.8
<u>Debaryomyces</u>	<u>hansenii var. hansenii</u>	IFO 0032	130.1	93.6
<u>Debaryomyces</u>	<u>hansenii var. hansenii</u>	IFO 0047	135.4	95.4
<u>Debaryomyces</u>	<u>hansenii var. hansenii</u>	IFO 0018	103.1	95.5
<u>Debaryomyces</u>	<u>kloeckeri</u>		140.7	95.4
<u>Debaryomyces</u>	<u>marama</u>	IFO 0668	161.5	95.4
<u>Debaryomyces</u>	<u>pseudopolymorphus</u>	IFO 1026	75.4	90.9
<u>Debaryomyces</u>	<u>robertsiae</u>	IFO 1277	278.7	66.1
<u>Debaryomyces</u>	<u>sp.</u>	IFO 0025	32.7	74.7
<u>Dekkera</u>	<u>anomala</u>	IFO 0627	115.8	94.9
<u>Dipodascus</u>	<u>armillariae</u>	IFO 0102	154.6	76.8
<u>Dipodascus</u>	<u>ovetensis</u>	IFO 1201	134.9	96.9
<u>Dipodascus</u>	<u>tetrasperma</u>	CBS 765.70	203.0	33.1
<u>Galactomyces</u>	<u>reessii</u>	CBS 179.60	378.8	25.0
<u>Geotrichum</u>	<u>candidum</u>	CBS 187.67	148.6	51.8
<u>Geotrichum</u>	<u>fermentans</u>	IFO 1199	98.4	93.9
<u>Geotrichum</u>	<u>fragrans</u>	CBS 164.32	29.1	94.1
<u>Geotrichum</u>	<u>lobieri</u>	CBS 252.61	81.4	14.8
<u>Hanseniaspora</u>	<u>guilliermondii</u>	IAM 4972	35.8	4.0
<u>Hansenula</u>	<u>methanolosa</u>		93.7	99.2
<u>Hansenula</u>	<u>polymorpha</u> DLI	AKU 4752	21.6	100.0
<u>Hormoascus</u>	<u>philentomus</u>	IFO 1847	176.6	84.2
<u>Hormoascus</u>	<u>platypodis</u>	IFO 1471	260.8	36.6
<u>Hyphopichia</u>	<u>burtonii</u>	IFO 0844	228.8	77.7
<u>Issatchenkia</u>	<u>orientalis</u>	IFO 1279	443.0	36.4
<u>Issatchenkia</u>	<u>terricola</u>	IFO 0933	258.4	100.0
<u>Kluyveromyces</u>	<u>lactis</u>	IFO 1012	324.6	48.8
<u>Kluyveromyces</u>	<u>marxianus</u>	IFO 0541	102.7	85.9
<u>Kluyveromyces</u>	<u>marxianus</u>	IFO 0288	419.3	27.1
<u>Kluyveromyces</u>	<u>polysporus</u>	IFO 0996	132.6	5.1
<u>Kluyveromyces</u>	<u>thermotolerans</u>	IFO 0662	500.0	100.0
<u>Komagataella</u>	<u>pastoris</u>	IFO 1013	246.0	66.4
<u>Lipomyces</u>	<u>starkeyi</u>	IFO 0678	28.6	100.0
<u>Metschnikowia</u>	<u>bicuspidata</u>	IFO 1408	381.0	39.6
<u>Metschnikowia</u>	<u>pulcherrima</u>	IFO 0561	359.4	48.0

Tabela 2

Mikroorganizem			Dobitek ($\mu\text{g/ml}$)	D. E. (%)
<i>Nakazawaea</i>	<i>holstii</i>	IFO 0980	0.5	100.0
<i>Ogataea</i>	<i>minuta</i> var. <i>minuta</i>	IFO 0975	18.2	9.4
<i>Ogataea</i>	<i>pini</i>	IFO 1342	268.3	43.1
<i>Ogataea</i>	<i>polymorpha</i>	IFO 0799	500.0	67.3
<i>Ogataea</i>	<i>polymorpha</i>	IFO 1475	275.0	6.0
<i>Ogataea</i>	<i>wickerhamii</i>	IFO 1706	144.8	73.6
<i>Pachysolen</i>	<i>tannophilus</i>	IFO 1007	488.2	5.4
<i>Pichia</i>	<i>canadensis</i>	IFO 0976	17.5	86.9
<i>Pichia</i>	<i>farinosa</i>	IAM 4369	208.9	71.4
<i>Pichia</i>	<i>jardinii</i>	IFO 0987	296.4	96.9
<i>Pichia</i>	<i>saitoi</i>	IAM 4945	97.4	22.5
<i>Pichia</i>	<i>toletana</i>	IFO 0950	300.0	13.1
<i>Pichia</i>	<i>triangularis</i>	IFO 0836	328.8	24.6
<i>Pichia</i>	<i>wickerhamii</i>	IFO 1278	175.8	81.7
<i>Rhodotonula</i>	<i>graminis</i>	IFO 0190	96.5	3.3
<i>Rhodotonula</i>	<i>minuta</i>	IFO 0387	108.3	12.0
<i>Rhodotonula</i>	<i>minuta</i>	IFO 0715	0.5	100.0
<i>Rhodsporidium</i>	<i>diobovatum</i>	IFO 0688	1.8	17.4
<i>Rhodsporidium</i>	<i>toruloides</i>	IFO 0413	10.2	46.7
<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	IFO 0251	375.2	18.3
<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	IFO 1265	442.5	80.5
<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	ATCC 9080	83.1	72.9
<i>Saccharomyces</i>	<i>rosei</i>	IFO 0252	456.8	83.1
<i>Saccharomyces</i>	<i>sake</i>		349.5	92.6
<i>Saccharomyces</i>	<i>steineri</i>	IAM 4608	98.3	100.0
<i>Saccharomyces</i>	<i>unisporus</i>	IFO 0215	97.0	84.5
<i>Saccharomycodes</i>	<i>ludwigii</i>	IFO 0339	99.0	43.8
<i>Saccharomycopsis</i>	<i>capsularis</i>	IFO 0672	112.5	76.8
<i>Saccharomycopsis</i>	<i>malanga</i>	IFO 1710	0.3	100.0
<i>Saturnospora</i>	<i>dispora</i>	IFO 0035	16.6	16.8
<i>Schizoblastosporion</i>	<i>kobayashii</i>	IFO 1644	207.0	54.6
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>	IFO 0347	119.5	55.2
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>	IFO 0362	96.3	56.0
<i>Schwanniomyces</i>	<i>occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	IFO 1840	219.7	46.9
<i>Sporidiobolus</i>	<i>johnsonii</i>	IFO 6903	2.7	100.0
<i>Sporobolomyces</i>	<i>pararoseus</i>	IFO 0471	66.0	67.8
<i>Sporobolomyces</i>	<i>salmonicolor</i>	IFO 1038	8.8	100.0
<i>Tonulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	IFO 0381	186.4	95.9
<i>Tonulopsis</i>	<i>methanolevscens</i>		337.0	33.2
<i>Tonulopsis</i>	<i>osboenis</i>	IFO 0646	58.5	16.9
<i>Tonulopsis</i>	sp.		99.7	84.9
<i>Tonulopsis</i>	<i>uvae</i>	IFO 0649	287.1	88.8
<i>Trichosporon</i>	<i>pullulans</i>		20.9	51.0
<i>Trichosporon</i>	sp.		4.6	19.2
<i>Trigonopsis</i>	<i>variabilis</i>	IFO 0671	126.4	13.4
<i>Willopsis</i>	<i>saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	IFO 0895	445.3	3.6
<i>Willopsis</i>	<i>saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	IFO 0992	394.4	6.1
<i>Yamadazyma</i>	<i>farinosa</i>	IFO 0459	472.7	86.7
<i>Yamadazyma</i>	<i>farinosa</i>	IFO 0602	97.0	55.0
<i>Yamadazyma</i>	<i>haplophila</i>	IFO 0947	7.2	66.4
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>naniwensis</i>	IFO 0524	263.1	43.0
<i>Zygosaccharomyces</i>	sp.	IFO 0522	282.8	9.4

Primer 12 terc.-butil ester (3R,5S)-6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline

Z uporabo 5 ml medija B, opisanega pred tem, kultiviramo mikroorganizme, navedene v tabeli 3, na enak način kot v Primeru 11. Nato izvedemo reakcijo na enak način. Rezultati so prikazani v tabeli 3.

Tabela 3

Mikroorganizem			Dobitek ($\mu\text{g/ml}$)	D. E. (%)
<u>Acidiphilium</u>	<u>cryptum</u>	IFO 14242	2.7	12.2
<u>Aerobacter</u>	<u>cloacae</u>	IAM 1221	29.2	79.0
<u>Alcaligenes</u>	<u>xylooxidans</u>	IFO 13495	13.2	38.9
<u>Alcaligenes</u>	<u>xylooxidans subsp. denitrificans</u>	IFO 12669	3.9	22.9
<u>Alcaligenes</u>	<u>xylooxidans subsp. denitrificans</u>	ATCC 15173	11.2	90.3
<u>Arthrobacter</u>	<u>globiformis</u>	ATCC 8010	0.4	100.0
<u>Arthrobacter</u>	<u>protophormiae</u>	IFO 12128	28.1	100.0
<u>Aureobacterium</u>	<u>esteraromaticum</u>	IFO 3752	245.9	24.1
<u>Bacillus</u>	<u>badius</u>	IAM 11059	0.3	100.0
<u>Bacillus</u>	<u>sphaericus</u>	IFO 3525	0.7	20.2
<u>Brevibacterium</u>	<u>ammomiagenes</u>	IFO 12071	193.1	98.8
<u>Buttiauxella</u>	<u>agrestis</u>	JCM 1090	25.7	40.3
<u>Cedecea</u>	<u>davisiae</u>	JCM 1685	3.2	37.0
<u>Cellulomonas</u>	<u>sp.</u>	JCM 2471	119.8	95.9
<u>Cellulomonas</u>	<u>turbata</u>	IFO 15015	88.	24.3
<u>Citrobacter</u>	<u>freundii</u>	IFO 12681	75.2	68.9
<u>Clostridium</u>	<u>cylindrosporum</u>	IFO 13695	4.8	50.6
<u>Comamonas</u>	<u>testosteroni</u>	IFO 12047	1.1	48.8
<u>Corynebacterium</u>	<u>acectoacidophilum</u>	ATCC 21476	211.3	63.4
<u>Corynebacterium</u>	<u>ammoniagenes</u>	IFO 12072	1.8	66.0
<u>Corynebacterium</u>	<u>glutamicum</u>	ATCC 21269	269.3	92.2
<u>Corynebacterium</u>	<u>glutamicum</u>	ATCC 13287	276.9	98.3
<u>Enterobacter</u>	<u>aerogenes</u>	IFO 13534	54.5	91.4
<u>Enterobacter</u>	<u>cloacae</u>	IFO 12935	490.7	88.9
<u>Erwinia</u>	<u>carotovora subsp. carotovora</u>	IFO 3830	1.1	100.0
<u>Escherichia</u>	<u>coli</u>	IFO 12734	23.2	53.9
<u>Flavobacterium</u>	<u>flavescens</u>		17.3	25.1
<u>Klebsiella</u>	<u>planticola</u>	IFO 3317	127.3	61.6
<u>Luteococcus</u>	<u>japonicus</u>	IFO 12422	0.2	100.0
<u>Microbacterium</u>	<u>arborescens</u>	IFO 3750	7.6	90.8
<u>Micrococcus</u>	<u>flavus</u>		4.0	30.7
<u>Micrococcus</u>	<u>luteus</u>	IFO 13867	500.0	13.5
<u>Ochrobactrum</u>	<u>sp.</u>	IFO 12950	12.5	51.4
<u>Proteus</u>	<u>inconstans</u>	IFO 12931	5.6	87.6
<u>Proteus</u>	<u>mirabilis</u>	IFO 3849	1.1	100.0
<u>Proteus</u>	<u>rettgeri</u>	IFO 13501	0.3	100.0
<u>Proteus</u>	<u>vulgaris</u>	IFO 3167	0.5	100.0
<u>Providencia</u>	<u>stuartii</u>	IFO 12930	2.9	76.9
<u>Pseudomonas</u>	<u>aeruginosa</u>	IAM 1007	2.8	100.0
<u>Pseudomonas</u>	<u>putida</u>	IFO 14164	11.2	31.1
<u>Pseudomonas</u>	<u>stutzeri</u>	IFO 13596	8.0	32.5
<u>Rhodococcus</u>	<u>equi</u>	JCM 1313	48.4	72.7
<u>Sarcina</u>	<u>lutea</u>		369.2	86.8
<u>Serratia</u>	<u>plymuthicum</u>	IFO 3055	2.7	100.0
<u>Serratia</u>	<u>proteamaculans subsp. proteamaculans</u>	IFO 12979	38.5	47.3
<u>Sphingobacterium</u>	<u>spiritivorum</u>	JCM 1277	61.9	33.6
<u>Tsukamurella</u>	<u>paurometabolum</u>	IFO 12160	40.6	8.2

Primer 13 terc.-butil ester (3R,5S)-6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline

Z uporabo 5 ml medija C, opisanega pred tem, kultiviramo mikroorganizme, navedene v tabeli 4, na enak način kot v Primeru 11. Iz 5 ml vsake kulture zberemo celice s centrifugiranjem, jih suspendiramo v 0,5 ml 100 mM fosfatnega pufra (pH 6,5), ki vsebuje 0,05 % terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline in 8 % glukoze, in reakcijo izvedemo na enak način. Rezultati so prikazani v tabeli 4.

Tabela 4

Mikroorganizem			Dobitek ($\mu\text{g/ml}$)	D. E. (%)
<u>Absidia</u>	<u>orchidis</u>	HUT 1036	4.4	25.2
<u>Acremonium</u>	<u>bacillisporum</u>	IFO 9387	1.0	100.0
<u>Aegerita</u>	<u>candida</u>	IFO 6988	500.0	92.8
<u>Agrocybe</u>	<u>cylindracea</u>	IFO 30299	96.2	59.5
<u>Amylostereum</u>	<u>areolatum</u>	IFO 9221	71.7	32.9
<u>Aspergillus</u>	<u>parasiticus</u>	IFO 4403	2.6	100.0
<u>Aspergillus</u>	<u>phoenicis</u>	IFO 6670	1.4	32.0
<u>Byssochlamys</u>	<u>fulva</u>	IFO 6307	164.6	99.2
<u>Chaetomidium</u>	<u>fimeti</u>	IFO 30419	0.5	100.0
<u>Chaetosartorya</u>	<u>stromatoides</u>	IFO 9652	1.6	100.0
<u>Cladosporium</u>	<u>resinae F. avellaneum</u>	IFO 6367	1.4	100.0
<u>Coprinus</u>	<u>cinereus</u>		401.3	76.0
<u>Coprinus</u>	<u>lagopus</u>	IFO 9533	37.9	93.7
<u>Coprinus</u>	sp.		1.9	100.0
<u>Crinipellis</u>	<u>stipitaria</u>	IFO 30259	16.6	40.6
<u>Endophragmia</u>	<u>alternata</u>	IFO 30204	10.4	54.9
<u>Flavolus</u>	<u>arcularius</u>		217.0	8.8
<u>Fomitopsis</u>	<u>pubertatis</u>		102.0	6.6
<u>Fusarium</u>	<u>merismoides</u>	IFO 30040	125.7	16.2
<u>Ganoderma</u>	<u>lucidum</u>	IFO 31863	2.1	31.8
<u>Glomerella</u>	<u>cingulata</u>	IFO 5257	47.8	78.7
<u>Laetiporus</u>	<u>sulphureusII</u>		66.9	32.8
<u>Lentinus</u>	<u>lepideus</u>	TD-832	165.2	35.1
<u>Lenzites</u>	<u>betulina</u>	IFO 8715	155.9	34.5
<u>Macrophoma</u>	<u>commelinae</u>	IFO 9569	210.2	99.3
<u>Monascus</u>	<u>purpureus</u>	IFO 5965	135.7	13.7
<u>Mortierella</u>	<u>isabellina</u>	IFO 7829	8.7	100.0
<u>Paecilomyces</u>	<u>varioti</u>	HUT 4028	34.6	100.0
<u>Penicillium</u>	<u>chermesinum</u>	IFO 5800	39.9	86.7
<u>Penicillium</u>	<u>chrysogenum</u>	IFO 4640	133.8	97.4
<u>Penicillium</u>	<u>expansum</u>	IFO 5854	4.5	51.1
<u>Penicillium</u>	<u>lilacinium</u>	IFO31914	47.2	95.1
<u>Phialophora</u>	<u>fastigiata</u>	IFO 6850	38.4	89.4
<u>Pholiota</u>	<u>aurivella</u>	IFO 30265	74.5	100.0
<u>Pholiota</u>	<u>limonella</u>	IFO 31868	0.8	100.0
<u>Pleurotus</u>	<u>dryinus</u>		123.9	26.0
<u>Pleurotus</u>	<u>ostreatus</u>		159.1	22.4
<u>Pleurotus</u>	<u>porrigens</u>		247.7	87.3
<u>Scopulariopsis</u>	<u>brevicaulis</u>	IFO 4843	88.6	23.9
<u>Sehizophyllum</u>	<u>commune</u>	IFO 6503	119.9	43.7
<u>Sporotrichum</u>	<u>aurantiacum</u>	IFO 9381	84.4	8.9
<u>Zygorhynchus</u>	<u>moelleri</u>	HUT 1305	167.6	93.5

Primer 14 terc.-butil (3R,5S)-6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline

Z uporabo 5 ml medija D, opisanega pred tem, kultiviramo mikroorganizme, navedene v tabeli 5, na enak način kot v Primeru 13. Nato izvedemo enako reakcijo. Rezultati so prikazani v tabeli 5.

Tabela 5

Mikroorganizem			Dobitek ($\mu\text{g/ml}$)	D. E. (%)
<u>Microtetraspora</u>	<u>roseoviolacea</u>	IFO 14098	27.8	15.4
<u>Streptomyces</u>	<u>achromogenes subsp. rubradiris</u>	IFO 14000	1.6	19.3
<u>Streptomyces</u>	sp.		29.4	42
<u>Streptomyces</u>	<u>aureus</u>	NIHJ 122	1	100

Primer 15 terc.-butil (3R,5S)-6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline

V bučko Sakaguchi z volumnom 500 ml damo 100 ml medija, sestavljenega iz Bacto-triptona 1,6 %, Bacto-ekstrakta kvasovk 1 % in natrijevega klorida 1 % (pH 7,0) in po sterilizaciji inokuliramo z Escherichia coli HB101 (pNTECRG); FERM BP-6898 (deponirano pri National Institute of Bioscience and Human-Technology (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japonska) 28. septembra 1999). Kultiviranje s stresanjem izvajamo pri 37 °C 12 ur. Po končani kultivaciji dodamo 1 g terc.-butil estra (5S)-6-benziloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline, 610 mg glukoze in 3 mg oksidirane niotinamid-adenin dinukleotid fosfata in reakcijo vodimo 24 ur, medtem pa vzdržujemo pH pri 6,5 z natrijevim hidroksidom. Po končani reakciji celice odstranimo s centrifugiranjem in supernatant ekstrahiramo z 2 deloma etil acetata, vsakim po 100 ml. Dobljeno organsko fazo dehidratiramo nad brezvodnim natrijevim sulfatom in topilo oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 900 mg terc.-butil estra 6-benziloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline kot olje. Z analizo po postopku, opisanem v Primeru 11, ugotovimo, da je diastereomerno razmerje tega produkta (3R,5S)/(3S,5S) = 99,5/0,5.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz/ppm); 1,47 (9H, s), 1,63-1,82 (2H, m), 2,45 (2H, d), 4,1-4,3 (4H, m), 7,32-7,7 (3H, m), 8,0-8,22 (2H, m)
 IR (čisto); 3450, 3000, 1730, 1040, 850, 720 cm^{-1} .

Primer 16 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 8,94 g (27,6 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, pripravljenega v Primeru 15, 35,8 ml 2,2-dimetoksiopropana in 2,5 ml metilen klorida, dodamo 269 mg (1,4 mmol) p-toluensulfonske kisline $\cdot \text{H}_2\text{O}$ in zmes mešamo pri 20 °C 4 ure, nato pa dodamo 500 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata. Vodno plast ločimo in nadalje ekstrahiramo z 2 deloma metilen klorida, vsakim po 20 ml, in organske plasti združimo. Združeno raztopino dehidratiramo nad brezvodnim natrijevim sulfatom in topilo oddestiliramo pod znižanim tlakom, da dobimo brezbarvno olje. Ta ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60; proizvod od Mercka; heksan : aceton = 10 : 1, da dobimo 7,24 g terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-5-hidroksi-3-oksoheksanojske kisline (bela trdna snov). Dobitek: 72 %.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz/ppm); 1,44 (9H, s), 1,45 (6H, d), 1,55-1,59 (2H, m), 2,35-2,46 (2H, m), 4,22-4,37 (4H, m), 7,43-7,59 (3H, m), 8,0-8,1 (2H, m)
 IR (čisto); 2975, 1720, 1270, 1150, 1100, 718 cm^{-1}
 tal.: od 55 do 56 °C.

Primer 17 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, pripravljenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 5,7 mg (0,03 mmol) p-toluensulfonske kisline $\cdot \text{H}_2\text{O}$ in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-

HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent : voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C.

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 78,8 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 7,5 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahidro-2H-piran: 5,9 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 3,0 %.

Primer 18 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, pripravljenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksipropana in 5 ml acetona, dodamo 5,7 mg (0,03 mmol) p-toluensulfonske kisline · 1H₂O in 11,9 mg (0,15 mmol) piridina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C).

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 93,1 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 3,4 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahidro-2H-piran: 0,1 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,1 %.

Primer 19 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 5,7 mg (0,03 mmol) p-toluensulfonske kisline · 1H₂O in 15,2 mg (0,15 mmol) trietilamina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetoneitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C).

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline : 93,3 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 3,0 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: 0,1 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,1 %.

Primer 20 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 5,7 mg (0,03 mmol) p-toluensulfonske kisline · 1H₂O in 10,2 mg (0,15 mmol) imidazola in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetoneitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C).

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline : 93,9 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 3,0 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: 0,1 %;

metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,1 %.

Primer 21 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksipropana in 5 ml acetona, dodamo 5,7 mg (0,03 mmol) p-toluensulfonske kisline · 1H₂O in 14,0 mg (0,15 mmol) 3-metilpiridina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvoec od Nomura Chemical, eluent: voda/acetoni-tril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C.

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline : 93,8 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 2,8 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahidro-2H-piran: 0,1 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,1 %.

Primer 22 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksipropana in 5 ml acetona, dodamo 5,7 mg (0,03 mmol) p-toluensulfonske kisline · 1H₂O in 18,3 mg (0,15 mmol) N,N-dimetilaminopiridina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm,

proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C.

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 93,8 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 2,3 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahidro-2H-piran: 0,1 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,1 %.

Primer 23 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 3,0 mg (0,03 mmol) metansulfonske kisline in 11,9 mg (0,15 mmol) piridina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C).

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 95,6 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 2,6 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahidro-2H-piran: 0,1 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: nedetektirano.

Primer 24 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 3,5 mg (0,03 mmol) trifluoroocetne kisline in 11,9 mg (0,15 mmol) piridina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C).

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 89,3 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 8,8 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: 0,1 %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: nedetektirano.

Primer 25 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 108 mg (90,2 mas.%, 0,3 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 62,4 mg (0,6 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 1,5 mg (0,015 mmol) žveplove kisline in 11,9 mg (0,15 mmol) piridina in zmes mešamo pri 40 °C 16 ur. To reakcijsko zmes analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C).

Vrednosti za dobitke sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline : 95,8 %; terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 2,3 %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: 0,1 %;

metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: nedetektirano.

Primer 26 Čiščenje terc.-butil estra 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 3,24 g (90,2 mas. %, 9,0 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 2,12 g (18,0 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 95 mg (0,45 mmol) p-toluensulfonske kisline · 1H₂O ter zmes mešamo pri 40 °C 4 ure. Topilo oddestiliramo pri znižanem tlaku in ostanek ekstrahiramo s 25 ml etil acetata in 10 ml nasičenega vodnega natrijevega hidrogenkarbonata. Po ločitvi vodne plasti organsko faza nadalje speremo z 10 ml vode. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 3,764 g brezbarvnega olja. To olje analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetonitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C). Vrednosti dobitkov sestavnih komponent so naslednje:

terc. butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 79,7 mas.%. Kot nečistoče so vsebovani: terc. butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 0,1 mas. %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: 0,1 mas. %; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 5,0 mas. %; terc.-butil ester 2-[(4S,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,2 mas. %.

V zgornje olje dodamo 30 ml heksana in zmes ohladimo na -30 °C (obdelovalna koncentracija: 10 % (masa substrata/volumen raztopine)). Dodamo približno 10 mg cepilnih kristalov in zmes nadalje temeljito mešamo pri enaki temperaturi 1 uro. Izločene kristale zberemo s sesalno filtracijo, temeljito posušimo in speremo z 10 ml hladnega heksana. Pridelek kristalov nato posušimo v vakuumu (pribl. $1,33 \cdot 10^2$ -

$6,65 \cdot 10^2$ Pa, 20 do 40 °C, 2 uri), da dobimo 2,46 g terc.-butil estra [(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline kot kristale (kristalizacijski rekuperacijski delež je 81 %). Iz analize zgornjih kristalov je razvidna čistota 97,2 mas.% (96,8 area %). Kot nečistoče pridelek kristalov vsebuje: metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 2,8 mas.% (2,8 area %); terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: nedetektirano; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: nedetektirano; terc.-butil ester 2-[(4S,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: nedetektirano.

Primer 27 Čiščenje terc.-butil estra 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino, sestavljeno iz 3,24 g (90,2 mas. %, 9,0 mmol) terc.-butil estra (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline, proizvedenega v Primeru 15, 2,12 g (18,0 mmol) 2,2-dimetoksiopropana in 5 ml acetona, dodamo 95 mg (0,45 mmol) p-toluensulfonske kisline $\cdot 1H_2O$ ter zmes mešamo pri 40 °C 4 ure. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku in ostanek ekstrahiramo s 25 ml etil acetata in 10 ml nasičenega vodnega natrijevega hidrogenkarbonata. Po ločitvi vodne plasti organsko plast nadalje speremo z 10 ml vode. Topilo nato oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo 3,764 g brezbarvnega olja. To olje analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (kolona: Develosil ODS-HG-3 4,6 x 250 mm, proizvod od Nomura Chemical, eluent: voda/acetoneitril = 50/50, hitrost pretoka: 1,0 ml/min, detektor: UV 220 nm, temperatura kolone: 40 °C). Vrednosti dobitkov sestavnih komponent so naslednje:

terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 86,0 mas.%. Kot nečistoče so vsebovani: terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: 0,1 mas. %; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: 0,1 mas.%; metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 5,4 mas. %; terc.-butil

ester 2-[(4S,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 0,2 mas. %.

V zgornje olje dodamo 30 ml metil cikloheksana in zmes ohladimo na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (obdelovalna koncentracija: 10 % (masa substrata/volumen raztopine)). Dodamo približno 10 mg cepilnih kristalov in zmes nadalje mešamo temeljito pri enaki temperaturi 1 uro. Izločene kristale zberemo s sesalno filtracijo, temeljito posušimo in speremo z 10 ml hladnega metil cikloheksana. Pridelek kristalov nato posušimo v vakuumu (pribl. $1,33 \cdot 10^2 - 6,65 \cdot 10^2$ Pa, 20 do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 uri), da dobimo 2,46 g terc.-butil estra [(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline kot kristale (kristalizacijski rekuperacijski delež je 81 %). Iz analize zgornjih kristalov je razvidna čistota 97,2 mas.% (96,8 area %). Kot nečistoče pridelek kristalov vsebuje: metil ester 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: 2,8 mas.% (2,8 area %); terc.-butil ester (5S)-6-benzoiloksi-3,5-dihidroksiheksanojske kisline: nedetektirano; (2S,4R)-4-hidroksi-6-okso-2-[(benzoiloksi)metil]tetrahydro-2H-piran: nedetektirano; terc.-butil ester 2-[(4S,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline: nedetektirano.

Primer 28 terc.-butil ester 2-[(4R,6S)-6-(hidroksimetil)-2,2-dimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline

V raztopino 3,64 g (10 mmol) terc.-butil estra 2-[(4R,6S)-2,2-dimetil-6-benzoiloksimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline, proizvedenega v Primeru 26, v metanolu (36 ml) dodamo 10 ml 1N vodne raztopine natrijevega hidroksida in zmes mešamo pri sobni temperaturi 2 uri. Tej reakcijski zmesi naravnamo pH na 7 s postopnim dodajanjem 1N klorovodikove kisline ob hlajenju z ledom. Metanol nato oddestiliramo pri znižanem tlaku in preostalo vodno raztopino ekstrahiramo z 2 deli metilen klorida, vsakim po 70 ml. Organsko plast dehidratiramo nad brezvodnim natrijevim sulfatom in topilo oddestiliramo pri znižanem tlaku, da dobimo brezbarvno olje. Ta ostanek očistimo s silikagelno kolonsko kromatografijo (Kieselgel 60, proizvod od Mercka; heksan : aceton = 5:1), da dobimo 2,34 g terc.-butil estra 2-

[(4R,6S)-6-(hidroksimetil)-2,2-dimetil-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline (bela trdna snov). Dobitek 90 %.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz/ppm; 1,29-1,52 (2H, m), 1,39 (3H, m), 1,45 (9H, s), 1,47 (3H, s), 2,05 (1H, bs), 2,33 (1H, dd), 2,44 (1H, dd), 3,47-3,53 (1H, m), 3,99-4,04 (1H, m), 4,27-4,33 (1H, m).

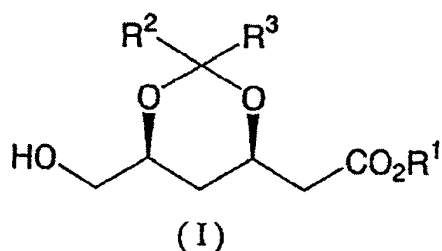
IR (čisto); 2980, 1720, 1365, 1200, 1150, 1020 cm⁻¹.

INDUSTRIJSKA UPORABLJIVOST

V skladu s predloženim izumom, sestavljenim, kot je navedeno zgoraj, lahko proizvedemo farmacevtske intermediate, zlasti optično aktivne derivate 2-[6-(hidroksimetil)-1,3-dioksan-4-il]ocetne kisline, ki so pomembni intermediati HMG-CoA reduktaznih inhibitorjev, iz poceni in lahko dosegljivih izhodnih materialov brez uporabe kakršnekoli posebne naprave, kot je nizkotemperaturni reaktor.

PATENTNI ZAHTEVKI

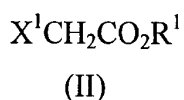
1. Proizvodni postopek za naslednjo spojino (I):



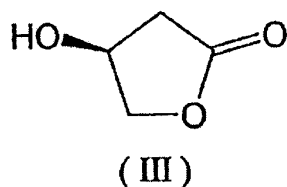
v formuli R^1 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^2 in R^3 vsak neodvisno pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika; R^2 in R^3 pa lahko skupaj tvorita obroč,

označen s tem, da obsega

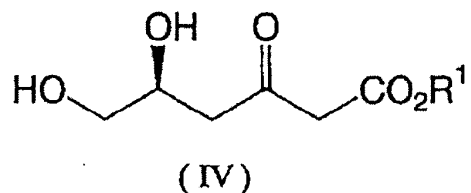
(1) reakcijo enolata, pripravljene s tem, da dopustimo, da deluje baza ali 0-valentna kovina na estrski derivat očetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (II):



v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj, in X^1 pomeni atom vodika ali halogena, z (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktonom, prikazanim z naslednjo formulo (III):

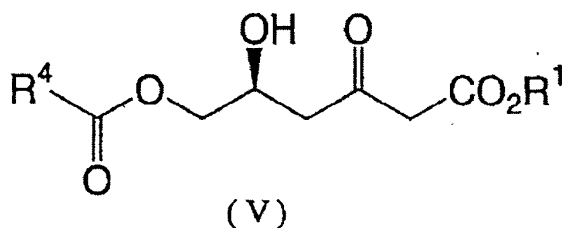


pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (IV):



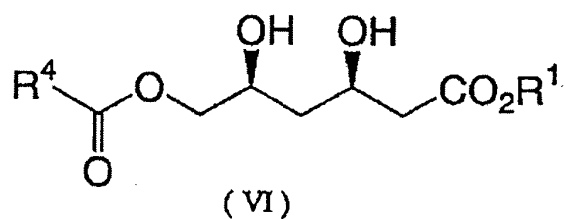
v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj,

(2) obdelovanje te spojine z acilirnim sredstvom v navzočnosti baze, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (V):



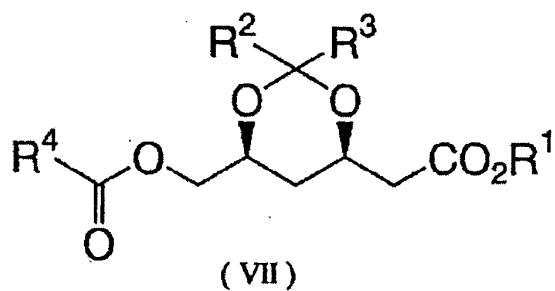
v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj, R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika,

(3) redukcijo te spojine z mikroorganizmom, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (VI):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj,

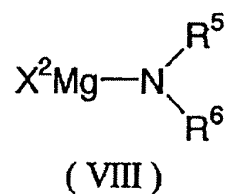
(4) obdelovanje te spojine z reagentom, ki tvori acetal, v navzočnosti kislinskega katalizatorja, da proizvedemo spojino, prikazano z naslednjo formulo (VII):



v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, in

(5) izpostavitve te spojine solvolizi v navzočnosti baze.

2. Proizvodni postopek po zahtevku 1, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom vodika in da magnezijev amid, prikazan z naslednjo formulo (VIII):



v formuli R^5 in R^6 vsak neodvisno pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika, aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika ali sililno skupino in X^2 pomeni atom halogena, uporabimo kot bazo pri pripravi enolata.

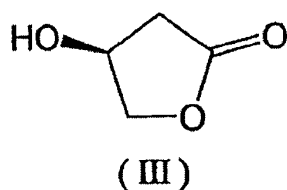
3. Proizvodni postopek po zahtevku 2, označen s tem, da v magnezijevemu amidu (VIII) vsak od R^5 in R^6 pomeni izopropilno skupino in je X^2 atom klora.

4. Proizvodni postopek po zahtevku 1, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom halogena in magnezij ali cink uporabimo kot 0-valentno kovino pri pripravi enolata.

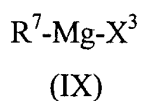
5. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 4, označen s tem, da reakcijo enolata z (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktonom (III) izvedemo v navzočnosti polietra.

6. Proizvodni postopek po zahtevku 5, označen s tem, da dimetoksietan uporabimo kot polietar.

7. Proizvodni postopek po zahtevku 1, označen s tem, da (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton, prikazan z naslednjo formulo (III):

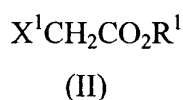


obdelamo vnaprej z Grignardovim reagentom, prikazanim z naslednjo formulo (IX):

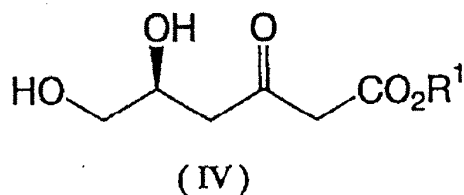


v formuli R^7 pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika in X^3 pomeni atom halogena,

in izpostavimo reakciji pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^\circ\text{C}$, z enolatom, pripravljenim tako, da dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina deluje na estrski derivat očetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (II):



v formuli sta R^1 in X^1 , kot je definirano zgoraj, da proizvedemo spojino prikazano z naslednjo formulo (IV):



v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj.

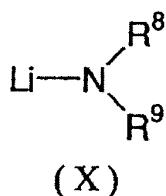
8. Proizvodni postopek po zahtevku 7, označen s tem, da je v Grignardovem reagentu (IX) R^7 terc.-butilna skupina in je X^3 atom klora.

9. Proizvodni postopek po zahtevku 1, označen s tem, da (S)- β -hidroksi- γ -butirolakton (III) obdelamo z bazo in magnezijevo spojino vnaprej in izpostavimo reakciji pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^\circ\text{C}$, z enolatom, pripravljenim tako, da dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina deluje na estrski derivat očetne kisline s formulo (II), da proizvedemo spojino, prikazano z zgornjo formulo (IV).

10. Proizvodni postopek po zahtevku 9, označen s tem, da je baza natrijev hidrid, litijev diizopropilamid ali kloromagnezijev diizopropilamid.

11. Proizvodni postopek po zahtevku 9 ali 10, označen s tem, da je magnezijeva spojina magnezijev klorid ali magnezijev bromid.

12. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 7 do 11, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom vodika in da litijev amid, prikazan z naslednjo formulo (X):

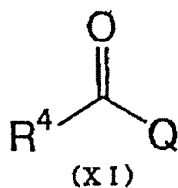


v formuli R^8 in R^9 vsak neodvisno pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika, aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika ali sililno skupino, uporabimo kot bazo pri pripravi enolata.

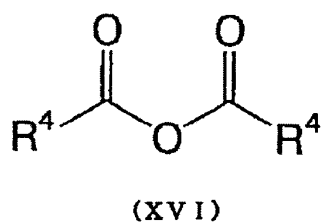
13. Proizvodni postopek po zahtevku 12, označen s tem, da v litijevem amidu (X) vsak od R^8 in R^9 pomeni izopropilno skupino.

14. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 7 do 11, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom halogena in da magnezij ali cink uporabimo kot 0-valentno kovino pri pripravi enolata.

15. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 14, označen s tem, da v stopnji acilacije spojino, prikazano z naslednjo formulo (XI):



ali spojino, prikazano z naslednjo formulo (XVI):



v zgornjih formulah R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika in Q pomeni zapuščajčo skupino, uporabimo kot acilirno sredstvo.

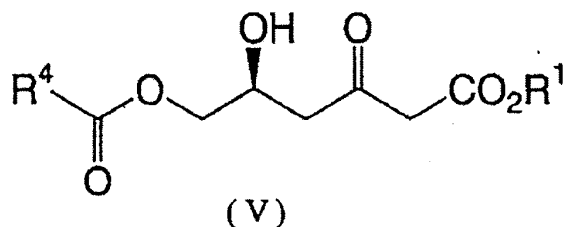
16. Proizvodni postopek po zahtevku 15, označen s tem, da Q v acilirnem sredstvu (XI) pomeni atom halogena.

17. Proizvodni postopek po zahtevku 16, označen s tem, da je atom halogena atom klora.

18. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 17, označen s tem, da amin uporabimo kot bazo v stopnji aciliranja.

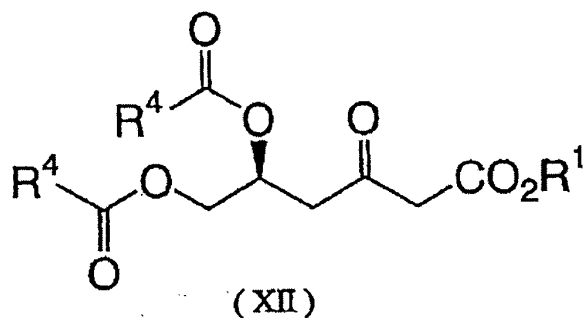
19. Proizvodni postopek po zahtevku 18, označen s tem, da trietilamin ali piridin uporabimo kot amin.

20. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 19, označen s tem, da v stopnji aciliranja spojino, kontaminirano z nečistočo in prikazano z naslednjo formulo (V):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj, obdelamo z alifatskim ogljikovodikovim topilom, da odstranimo nečistoče, ki kontaminirajo spojino, prikazano z zgornjo formulo (V), in spojino, prikazano z zgornjo formulo (V), dobimo v kristalni obliki.

21. Proizvodni postopek po zahtevku 20, označen s tem, da je nečistoča, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (V), spojina, prikazana z naslednjo formulo (XII):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj.

22. Proizvodni postopek po zahtevku 20 ali 21, označen s tem, da je alifatsko ogljikovodikovo topilo pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan ali izooktan.

23. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 20 do 22, označen s tem, da kristalizacijo izvedemo z dodatno uporabo pomožnega topila, pri čemer je topilo uporabljeno za izboljšanje vsaj enega parametra izmed topnosti, dobitka, obdelovalne koncentracije, učinka čiščenja in fizikalnih lastnosti kristalov spojine, prikazane z zgornjo formulo (V), ki jih lahko dobimo.

24. Proizvodni postopek po zahtevku 23, označen s tem, da pomožno topilo uporabimo v taki količini, da masno razmerje pomožnega topila in alifatskega ogljikovodikovega topila (pomožno topilo/alifatsko ogljikovodiko topilo) ni večje od 1 pri dokončanem postopku kristalizacije.

25. Proizvodni postopek po zahtevku 23 ali 24, označen s tem, da je pomožno topilo vsaj ena vrsta, izbrana iz skupine, ki jo sestavljajo toluen, etil acetat, metil terc.-butil eter in metilen klorid.

26. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 25, označen s tem, da kulturno brozgo, celice ali obdelane celice mikroorganizma uporabimo v redukcijski stopnji z uporabo mikroorganizma, pri čemer je mikroorganizem za uporabo izbran izmed mikroorganizmov, ki spadajo k rodovom: Ashbya, Botryosascus, Brettanomyces, Candida, Citeromyces, Clavispora, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Dipodascus, Galactomyces, Geotrichum, Hanseniaspora, Hansenula, Hormoascus, Hyphopichia, Issatchenkia, Kluyveromyces, Komagataella, Lipomyces, Metschnikowia, Nakazawaea, Ogataea, Pachysolen, Pichia, Rhodotorula, Rhodsporidium, Saccharomyces, Saccharomycodes, Saccharomycopsis, Saturnospora, Schizoblastosporion, Schizosaccharomyces, Schwanniomyces, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Torulaspora, Torulopsis, Trichosporon, Trigonopsis, Willopsis, Yamadazyma, Zygosaccharomyces, Acidiphilium, Aerobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Aureobacterium, Bacillus, Brevibacterium, Buttiauxella, Cedecea, Cellulomonas, Citrobacter, Clostridium, Comamonas, Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Luteococcus, Microbacterium, Micrococcus, Ochrobactrum, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Rhodococcus, Sarcina, Serratia, Sphingobacterium, Tsukamurella, Absidia,

Acremonium, Aegerita, Agrocybe, Amylostereum, Aspergillus, Byssochlamys, Chaetomidium, Chaetosartorya, Cladosporium, Coprinus, Crinipellis, Endophragma, Flavolus, Fomitopsis, Fusarium, Ganoderma, Glomerella, Laetiporus, Lentinus, Lenzites, Macrophoma, Monascus, Mortierella, Paecilomyces, Penicillium, Phialophora, Pholiota, Pleurotus, Scopulariopsis, Schizophyllum, Sporotrichum, Zygorhynchus, Microtetraspora in Streptomyces.

27. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 26, označen s tem, da je mikroorganizem za uporabo v redukcijski stopnji z uporabo mikroorganizma izbran iz skupine, ki jo sestavljajo: Ashbya gossypii, Botryoaescus synnaedendrus, Brettanomyces custersianus, Candida arborea, Candida catenulata, Candida fennica, Candida galacta, Candida haemulonii, Candida magnoliae, Candida musae, Candida nitratophila, Candida parapsilosis, Candida pararugosa, Candida stellata, Citeromyces matritensis, Clavispora lusitaniae, Cryptococcus laurentii, Debaryomyces carsonii, Debaryomyces hansenii var. fabryi, Debaryomyces hansenii var. hansenii, Debaryomyces kloeckeri, Debaryomyces marama, Debaryomyces pseudopolymorphus, Debaryomyces robertsiae, Debaryomyces sp., Dekkera anomala, Dipodascus armillariae, Dipodascus ovetensis, Dipodascus tetrasperma, Galactomyces reessii, Geotrichum candidum, Geotrichum fermentans, Geotrichum fragrans, Geotrichum loubieri, Hanseniaspora guilliermondii, Hansenula methanolosa, Hansenula polymorpha, Hormoascus philentomus, Hormoascus platypodis, Hyphopichia burtonii, Issatchenkia orientalis, Issatchenkia terricola, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces polysporus, Kluyveromyces thermotolerans, Komagataella pastoris, Lipomyces starkeyi, Metschnikowia bicuspidata, Metschnikowia pulcherrima, Nakazawaea holstii, Ogataea minuta var. minuta, Ogataea pini, Ogataea polymorpha, Ogataea wickerhamii, Pachysolen tannophilus, Pichia canadensis, Pichia farinose, Pichia jandinii, Pichia saitoi, Pichia toletana, Pichia triangularis, Pichia wickerhamii, Rhodotorula graminis, Rhodotorula minuta, Rhodsporidium diobovatum, Rhodsporidium toruloides, Saccharomyces bayanus, Saccharomyces pastorianus, Saccharomyces rosei, Saccharomyces sake, Saccharomyces steineri, Saccaromyces unisporus, Saccharomycodes ludwigii, Saccharomycopsis capsularis, Saccharomycopsis malanga, Saturnospora dispersa, Schizoblastosporion kobayasii, Schizosaccharomyces pombe, Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis, Sporidiobolus johnsonii, Sporobolomyces pararoseus, Sporobolomyces salmonicolor, Torulasporea delbrueckii, Torulopsis

methanolevescens, Torulopsis osboenis, Torulopsis sp., Torulopsis uvae, Trichosporon pullulans, Trichosporon sp. Trigonopsis variabilis, Willopsis saturnus var. mrakii, Willopsis saturnus var. saturnus, Yamadazyma farinosa, Yamadazyma haplophila, Zygosaccharomyces naniwensis, Zygosaccharomyces sp., Acidiphilium cryptum, Aerobacter cloacae, Alcaligenes xylooxidans, Alcaligenes xylooxidans subsp. denitrificans, Arthrobacter globiformis, Arthrobacter protophormiae, Aureobacterium esteraromaticum, Bacillus badius, Bacillus sphaericus, Brevibacterium ammomiagenes, Buttiauxella agrestis, Cedecea davisiae, Cellulomonas sp., Cellulomonas turbata, Citrobacter freundii, Clostridium cylindrosporium, Comamonas testosteroni, Corynebacterium acetooacidophilum, Corynebacterium ammoniagenes, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium glutamicus, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Erwinia carotovora subsp. carotovora, Escherichia coli, Flavobacterium flavescens, Klebsiella planticola, Luteococcus japonicus, Microbacterium arborescens, Micrococcus flavus, Micrococcus luteus, Ochrobactrum sp., Proteus inconstans, Proteus mirabilis, Proteus rettgeri, Proteus vulgaris, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Rhodococcus equi, Sarcina lutea, Serratia plymuthicum, Serratia proteamaculans subsp. proteamaculans, Sphingobacterium spiritivorum, Tsukamurella paurometabolum, Absidia orchidis, Acremonium bacillisporum, Aegerita candida, Agrocybe cylindracea, Amylostereum areolatum, Aspergillus parasiticus, Aspergillus phoenicis, Byssochlamys fulva, Chaetomidium fimeti, Chaetosartorya stromatoides, Cladosporium resinae f. avellaneum, Coprinus cinereus, Coprinus lagopus, Coprinus sp., Crinipellis stipitaria, Endophragmia alternata, Flavolus arcularius, Fomitopsis pubertatis, Fusarium merismoides, Ganoderma lucidum, Glomerella cingulata, Laetiporus sulphureus, Lentinus lepideus, Lenzites betulina, Macrophoma commelinae, Monascus purpureus, Mortierella isabellina, Paecilomyces varioti, Penicillium chermesinum, Penicillium chrysogenum, Penicillium expansum, Penicillium lilacinium, Phialophora fastigiata, Pholiota aurivella, Pholiota limonella, Pleurotus dryinus, Pleurotus ostreatus, Pleurotus porrigens, Scopulariopsis brevicaulis, Sehizophyllum commune, Sporotrichum aurantiacum, Zygorhynchus moelleri, Microtetraspora roseoviolacea, Streptomyces achromogenes subsp. rubradiris, Streptomyces sp. in Streptomyces aureus.

28. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 27, označen s tem, da aaminsko sol, sestavljeno iz kisline in amina, uporabimo kot kislinski katalizator v stopnji, ki tvori acetal.

29. Proizvodni postopek po zahtevku 28, označen s tem, da aminske sol pripravimo in uporabimo *in situ*.

30. Proizvodni postopek po zahtevku 28 ali 29, označen s tem, da je kislina klorovodikova, bromovodikova, žveplova, metansulfonska, benzensulfonska, p-toluensulfonska ali trifluoroocetna kislina.

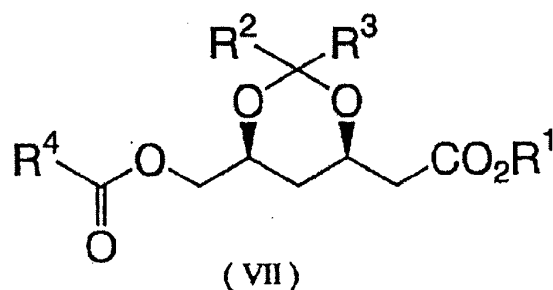
31. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 28 do 30, označen s tem, da je amin terciarni amin.

32. Proizvodni postopek po zahtevku 31, označen s tem, da je terciarni amin trietilamin, N-metilmorfolin, diizopropiletilamin, piridin, 2-metilpiridin, 3-metilpiridin ali imidazol.

33. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 28 do 32, označen s tem, da amin uporabimo v prebitni količini glede na kislino.

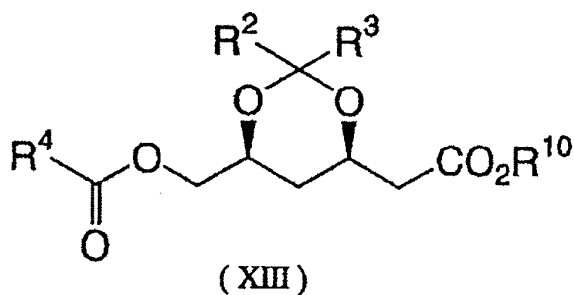
34. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 33, označen s tem, da je reagent, ki tvori acetal, 2,2-dimetoksipropan.

35. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 34, označen s tem, da spojino, kontaminirano z nečistočo in prikazano z naslednjo formulo (VII):



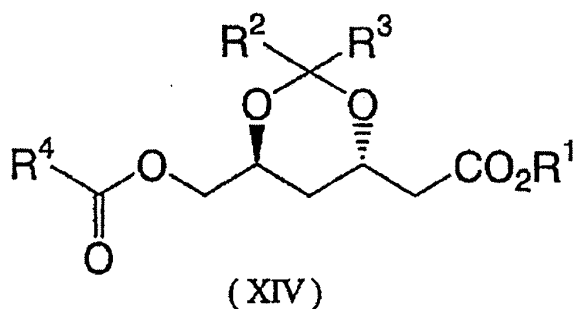
v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, obdelamo z alifatskim ogljikovodikovim topilom, da odstranimo nečistoče, ki kontaminirajo spojino, prikazano z zgornjo formulo (VII), in spojino, prikazano z zgornjo formulo (VII), dobimo v kristalni obliki.

36. Proizvodni postopek po zahtevku 35, označen s tem, da je nečistoča, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (VII), vsaj ena spojina, izbrana iz skupine, ki jo sestavljajo: spojina, prikazana z naslednjo formulo (XIII):

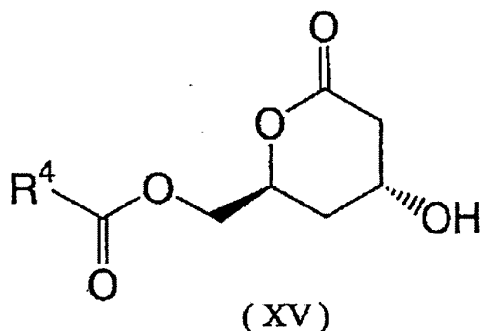


v formuli so R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, in R^{10} pomeni nižjo alkilno skupino in je različen od R^1 ,

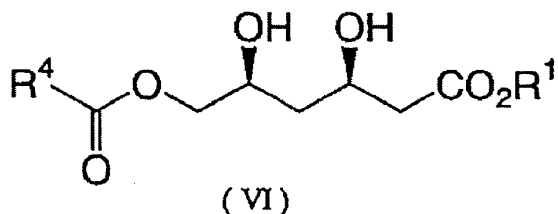
diastereomer, prikazan z naslednjo formulo (XIV):



v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, spojina, prikazana z naslednjo formulo (XV):



v formuli je R^4 , kot je definirano zgoraj,
in spojina, prikazana z naslednjo formulo (VI):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj.

37. Proizvodni postopek po zahtevku 36, označen s tem, da je R^{10} v spojini (XIII) metilna skupina.

38. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 35 do 37, označen s tem, da je alifatsko ogljikovodikovo topilo pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan ali izooktan.

39. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 35 do 38, označen s tem, da kristalizacijo izvedemo z dodatno uporabo pomožnega topila, pri čemer je topilo uporabljeno za izboljšanje vsaj enega parametra izmed topnosti, dobitka, obdelovalne koncentracije, učinka čiščenja in fizikalnih lastnosti kristalov spojine, prikazane z zgornjo formulo (VII), ki jih lahko dobimo.

40. Proizvodni postopek po zahtevku 39, označen s tem, da pomožno topilo uporabimo v taki količini, da masno razmerje pomožnega topila in alifatskega ogljikovodikovega topila (pomožno topilo/alifatsko ogljikovodikovo topilo) ni večje od 1 pri dokončanem postopku kristalizacije.

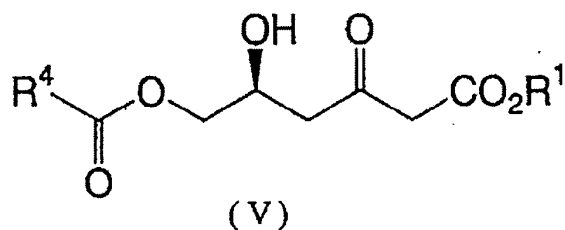
41. Proizvodni postopek po zahtevku 39 ali 40, označen s tem, da je pomožno topilo vsaj ena vrsta, izbrana iz skupine, ki jo sestavljajo toluen, etil acetat, metil terc.-butil eter in metilen klorid.

42. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 41, označen s tem, da je R^1 terc.-butilna skupina.

43. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 42, označen s tem, da vsak od R^2 in R^3 pomeni metilno skupino.

44. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 1 do 43, označen s tem, da je R^4 fenilna skupina.

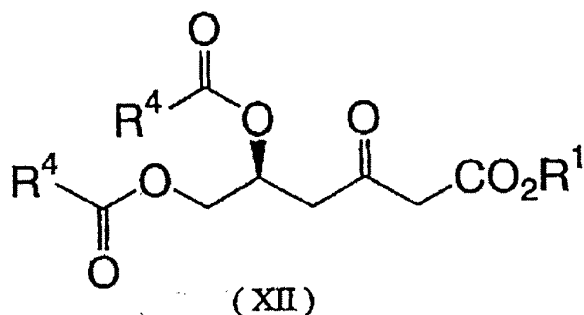
45. Izolacijski/čistilni postopek, označen s tem, da obsega obdelovanje spojine, kontaminirane z nečistočo in prikazane z naslednjo formulo (V):



v formuli R^1 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika in R^4 pomeni vodik,

alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika,
z alifatskim ogljikovodikovim topilom, da odstranimo nečistočo, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (V),
in pridobivanje spojine, prikazane z zgornjo formulo (V), v kristalni obliki.

46. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 45, označen s tem, da je nečistoča, ki kontaminira spojino z zgornjo formulo (V), spojina, prikazana z naslednjo formulo (XII):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj.

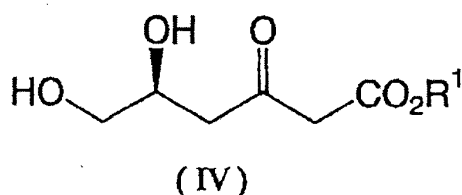
47. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 45 ali 46, označen s tem, da je alifatsko ogljikovodikovo topilo pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan ali izooktan.

48. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 45 do 47, označen s tem, da kristalizacijo izvedemo z dodatno uporabo pomožnega topila, pri čemer je topilo uporabljeno za izboljšanje vsaj enega parametra izmed topnosti, dobitka, obdelovalne koncentracije, učinka čiščenja in fizikalnih lastnosti kristalov spojine, prikazane z zgornjo formulo (V), ki jih lahko dobimo.

49. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 48, označen s tem, da pomožno topilo uporabimo v taki količini, da masno razmerje pomožnega topila in alifatskega ogljikovodikovega topila (pomožno topilo/alifatsko ogljikovodikovo topilo) ni večje od 1 pri dokončanem postopku kristalizacije.

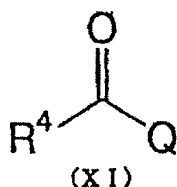
50. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 48 ali 49, označen s tem, da je pomožno topilo vsaj ena vrsta, izbrana iz skupine, ki jo sestavljajo toluen, etil acetat, metil terc.-butil eter in metilen klorid.

51. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 45 do 50, označen s tem, da uporabimo spojino, prikazano z zgornjo formulo (V), pri čemer spojino proizvedemo z obdelovanjem spojine, prikazane z naslednjo formulo (IV):

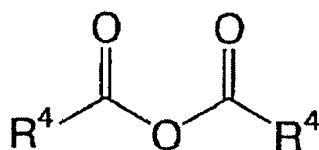


v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj,
z acilrnim sredstvom v navzočnosti baze.

52. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 51, označen s tem, da spojino, prikazano z naslednjo formulo (XI):



ali spojino, prikazano z naslednjo formulo (XVI):



(XVI)

v zgornjih formulah R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika in Q pomeni zapuščajčo skupino, uporabimo kot acilirno sredstvo.

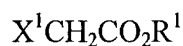
53. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 52, označen s tem, da je Q v acilirnem sredstvu (XI) atom halogena.

54. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 53, označen s tem, da je atom halogena atom klora.

55. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 51 do 54, označen s tem, da amin uporabimo kot bazo.

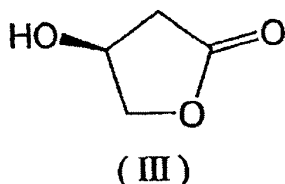
56. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 55, označen s tem, da trietilamin ali piridin uporabimo kot amin za uporabo v acilacijski stopnji.

57. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 51 do 56, označen s tem, da uporabimo spojino, prikazano z zgornjo formulo (IV), pri čemer spojino proizvedemo z reakcijo enolata, pripravljenega tako, da dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina, deluje na estrski derivat očetne kisline, prikazan z naslednjo formulo (II):



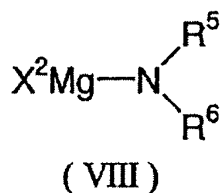
(II)

v formuli je R^1 , kot je definirano zgoraj, in X^1 pomeni atom vodika ali halogena, z (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktonom, prikazanim s formulo (III):



pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^\circ\text{C}$.

58. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 57, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom vodika in da magnezijev amid, prikazan z naslednjo formulo (VIII):



v formuli R^5 in R^6 vsak neodvisno pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika, aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika ali sililno skupino in X^2 pomeni atom halogena, uporabimo kot bazo pri pripravi enolata.

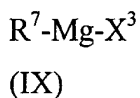
59. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 58, označen s tem, da v magnezijevem amidu (VIII) vsak od R^5 in R^6 pomeni izopropilno skupino in X^2 pomeni atom klora.

60. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 57, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom halogena in da uporabimo magnezij ali cink kot 0-valentno kovino pri pripravi enolata.

61. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 57 do 60, označen s tem, da reakcijo enolata z (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktonom (III) izvedemo v navzočnosti polietra.

62. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 61, označen s tem, da dimetoksietan uporabimo kot polietar.

63. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 51 do 56, označen s tem, da uporabimo spojino, prikazano z zgornjo formulo (IV), pri čemer spojino proizvedemo z obdelovanjem (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona (III) vnaprej z Grignardovim reagentom, prikazanim z naslednjo formulo (IX):



v formuli R^7 pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika in X^3 pomeni atom halogena, in reakcijo pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^\circ\text{C}$, z enolatom, pripravljenim tako, da dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina deluje na estrski derivat očetne kisline s formulo (II).

64. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 63, označen s tem, da je v Grignardovem reagentu (IX) R^7 terc.-butilna skupina in je X^3 atom klora.

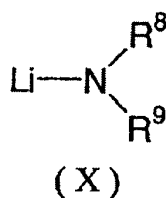
65. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 51 do 56, označen s tem, da uporabimo spojino, prikazano z zgornjo formulo (IV),

pri čemer spojino proizvedemo z obdelovanjem (S)- β -hidroksi- γ -butirolaktona (III) vnaprej z bazo in magnezijevo spojino, in reakcijo pri temperaturi, ki ni nižja od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, z enolatom, pripravljenim tako, da dopustimo, da baza ali 0-valentna kovina, deluje na estrski derivat očetne kisline s formulo (II).

66. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 65, označen s tem, da je baza natrijev hidrid, litijev diizopropilamid ali kloromagnezijev diizopropilamid.

67. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 65 ali 66, označen s tem, da je magnezijeva spojina magnezijev klorid ali magnezijev bromid.

68. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 63 do 67, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom vodika in da litijev amid, prikazan z naslednjo formulo (X):



v formuli R^8 in R^9 vsak neodvisno pomeni alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika, aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika ali sililno skupino, uporabimo kot bazo pri pripravi enolata.

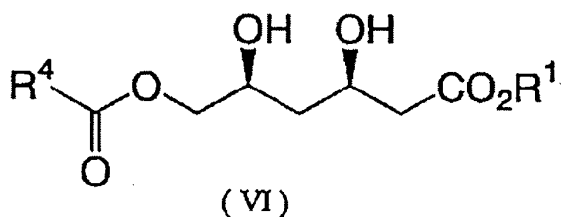
69. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 68, označen s tem, da v litijevem amidu (X) vsak od R^8 in R^9 pomeni izopropilno skupino.

70. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 63 do 67, označen s tem, da je X^1 v estrskem derivatu očetne kisline s formulo (II) atom halogena in magnezij ali cink uporabimo kot 0-valentno kovino pri pripravi enolata.

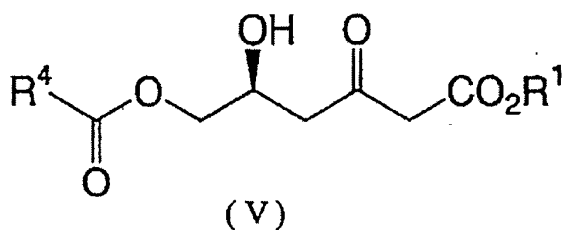
71. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 45 do 70, označen s tem, da je R^1 terc.-butilna skupina.

72. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 45 do 71, označen s tem, da je R^4 fenilna skupina.

73. Proizvodni postopek za spojino, prikazano z naslednjo formulo (VI):



v formuli R^1 pomeni atom vodika, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika, R^4 pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino z 7 do 12 atomi ogljika, označen s tem, da obsega redukcijo spojine, prikazane z naslednjo formulo (V):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj, z mikroorganizmom.

74. Proizvodni postopek po zahtevku 73, označen s tem, da uporabimo kulturno brozgo, celice ali obdelane celice mikroorganizma, pri čemer mikroorganizem izberemo izmed mikroorganizmov, ki spadajo k rodovom: Ashbya, Botryosascus, Brettanomyces, Candida, Citeromyces, Clavispora, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Dipodascus, Galactomyces, Geotrichum, Hanseniaspora, Hansenula, Hormoascus, Hyphopichia, Issatchenkia, Kluyveromyces, Komagataella, Lipomyces, Metschnikowia, Nakazawaea, Ogataea, Pachysolen, Pichia, Rhodotorula, Rhodsporidium, Saccharomyces, Saccharomycodes, Saccharomycopsis, Saturnospora, Schizoblastosporion, Schizosaccharomyces, Schwanniomyces, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Torulasporea, Torulopsis, Trichosporon, Trigonopsis, Willopsis, Yamadazyma, Zygosaccharomyces, Acidiphilium, Aerobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Aureobacterium, Bacillus, Brevibacterium, Buttiauxella, Cedecea, Cellulomonas, Citrobacter, Clostridium, Comamonas, Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Luteococcus, Microbacterium, Micrococcus, Ochrobactrum, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Rhodococcus, Sarcina, Serratia, Sphingobacterium, Tsukamurella, Absidia, Acremonium, Aegerita, Agrocybe, Amylostereum, Aspergillus, Byssochlamys, Chaetomidium, Chaetosartorya, Cladosporium, Coprinus, Crinipellis, Endophragmia, Flavolus, Fomitopsis, Fusarium, Ganoderma, Glomerella, Laetiporus, Lentinus, Lenzites, Macrophoma, Monascus, Mortierella, Paecilomyces, Penicillium, Phialophora, Pholiota, Pleurotus, Scopulariopsis, Sehizophyllum, Sporotrichum, Zygorhynchus, Microtetraspora in Streptomyces.

75. Proizvodni postopek po zahtevku 73 ali 74, označen s tem, da je mikroorganizem izbran iz skupine, ki jo sestavljajo: Ashbya gossypii, Botryosascus synnaedendus, Brettanomyces custersianus, Candida arborea, Candida catenulata, Candida fennica, Candida galacta, Candida haemulonii, Candida magnoliae, Candida musae, Candida nitratophila, Candida parapsilosis, Candida pararugosa, Candida stellata, Citeromyces matritensis, Clavispora lusitaniae, Cryptococcus laurentii, Debaryomyces carsonii, Debaryomyces hansenii var. fabryi, Debaryomyces hansenii var. hansenii, Debaryomyces klockeri, Debaryomyces marama, Debaryomyces pseudopolymorphus, Debaryomyces robertsiae, Debaryomyces sp., Dekkera anomala, Dipodascus armillariae, Dipodascus ovetensis, Dipodascus tetrasperma, Galactomyces reessii, Geotrichum candidum, Geotrichum

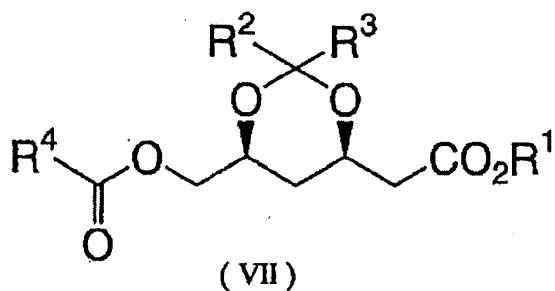
fermentans, Geotrichum fragrans, Geotrichum loubieri, Hanseniaspora guilliermondii,
Hansenula methanolosa, Hansenula polymorpha, Hormoascus philentomus, Hormoascus
platypodis, Hyphopichia burtonii, Issatchenkia orientalis, Issatchenkia terricola,
Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces polysporus,
Kluyveromyces thermotolerans, Komagataella pastoris, Lipomyces starkeyi, Metschnikowia
bicuspidata, Metschnikowia pulcherrima, Nakazawaea holstii, Ogataea minuta var. minuta,
Ogataea pini, Ogataea polymorpha, Ogataea wickerhamii, Pachysolen tannophilus, Pichia
canadensis, Pichia farinose, Pichia jandinii, Pichia saitoi, Pichia toletana, Pichia triangularis,
Pichia wickerhamii, Rhodotorula graminis, Rhodotorula minuta, Rhodsporidium diobovatum,
Rhodsporidium toruloides, Saccharomyces bayanus, Saccharomyces pastorianus,
Saccharomyces rosei, Saccharomyces sake, Saccharomyces steineri, Saccaromyces unisporus,
Saccharomycodes ludwigii, Saccharomycopsis capsularis, Saccharomycopsis malanga,
Saturnospora dispersa, Schizoblastosporion kobayashii, Schizosaccharomyces pombe,
Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis, Sporidiobolus johnsonii, Sporobolomyces
pararoseus, Sporobolomyces salmonicolor, Torulaspora delbrueckii, Torulopsis
methanolevescens, Torulopsis osboeni, Torulopsis sp., Torulopsis uvae, Trichosporon
pullulans, Trichosporon sp., Trigonopsis variabilis, Willopsis saturnus var. mrakii, Willopsis
saturnus var. saturnus, Yamadazyma farinosa, Yamadazyma haplophila, Zygosaccharomyces
naniwensis, Zygosaccharomyces sp., Acidiphilium cryptum, Aerobacter cloacae, Alcaligenes
xylosoxidans, Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans, Arthrobacter globiformis,
Arthrobacter protophormiae, Aureobacterium esteraromaticum, Bacillus badius, Bacillus
sphaericus, Brevibacterium ammoniagenes, Buttiauxella agrestis, Cedecea davisiae,
Cellulomonas sp., Cellulomonas turbata, Citrobacter freundii, Clostridium cylindrosporum,
Comamonas testosteroni, Corynebacterium acetooacidophilum, Corynebacterium
ammoniagenes, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium glutamicus, Enterobacter
aerogenes, Enterobacter cloacae, Erwinia carotovora subsp. carotovora, Escherichia coli,
Flavobacterium flavescens, Klebsiella planticola, Luteococcus japonicus, Microbacterium
arborescens, Micrococcus flavus, Micrococcus luteus, Ochrobactrum sp., Proteus inconstans,
Proteus mirabilis, Proteus rettgeri, Proteus vulgaris, Providencia stuartii, Pseudomonas
aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Rhodococcus equi, Sarcina lutea,
Serratia plymuthicum, Serratia proteamaculans subsp. proteamaculans, Sphingobacterium
spiritivorum, Tsukamurella paurometabolum, Absidia orchidis, Acremonium bacillisporum,
Aegerita candida, Agrocybe cylindracea, Amylostereum areolatum, Aspergillus parasiticus,
Aspergillus phoenicis, Byssoschlamys fulva, Chaetomidium fimeti, Chaetosartorya

stromatoides, Cladosporium resinae F. avellaneum, Coprinus cinereus, Coprinus lagopus, Coprinus sp., Crinipellis stipitaria, Endophragmia alternata, Flavolus arcularius, Fomitopsis pubertatis, Fusarium merismoides, Ganoderma lucidum, Glomerella cingulata, Laetiporus sulphureus, Lentinus lepideus, Lenzites betulina, Macrophoma commelinae, Monascus purpureus, Mortierella isabellina, Paecilomyces varioti, Penicillium chermesinum, Penicillium chrysogenum, Penicillium expansum, Penicillium lilacinium, Phialophora fastigiata, Pholiota aurivella, Pholiota limonella, Pleurotus dryinus, Pleurotus ostreatus, Pleurotus porrigens, Scopulariopsis brevicaulis, Sehizophyllum commune, Sporotrichum aurantiacum, Zygorhynchus moelleri, Microtetraspora roseoviolacea, Streptomyces achromogenes subsp. rubradiris, Streptomyces sp. in Streptomyces aureus.

76. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 73 do 75, označen s tem, da je R¹ terc.-butilna skupina.

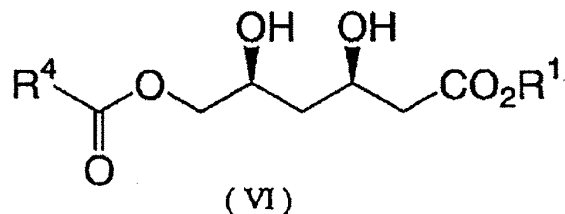
77. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 73 do 76, označen s tem, da je R⁴ fenilna skupina.

78. Proizvodni postopek za spojino, prikazano z naslednjo formulo (VII):



v formuli R¹ pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika, R⁴ pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika, R² in R³ vsak neodvisno pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali

aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika, in R^2 in R^3 lahko skupaj tvorita obroč, označen s tem, da obsega obdelovanje spojine, prikazane z naslednjo formulo (VI):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj, z reagentom, ki tvori acetal, z uporabo aminske soli, sestavljene iz kisline in amina, kot katalizatorja.

79. Proizvodni postopek po zahtevku 78, označen s tem, da aaminsko sol pripravimo in uporabimo *in situ*.

80. Proizvodni postopek po zahtevku 78 ali 79, označen s tem, da je kislina klorovodikova, bromovodikova, žveplova, metansulfonska, benzensulfonska, p-toluensulfonska ali trifluoroocetna kislina.

81. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 78 do 80, označen s tem, da je amin terciarni amin.

82. Proizvodni postopek po zahtevku 81, označen s tem, da je terciarni amin trietilamin, N-metilmorfolin, diizopropiletilamin, piridin, 2-metilpiridin, 3-metilpiridin ali imidazol.

83. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 78 do 82, označen s tem, da amin uporabimo v prebitni količini glede na kislino.

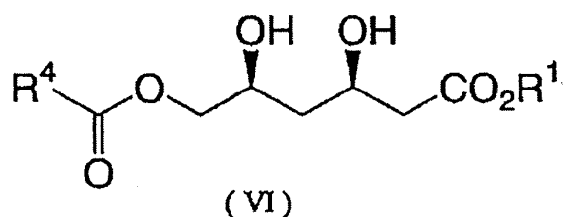
84. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 78 do 83, označen s tem, da je reagent, ki tvori acetal, 2,2-dimetoksiopropan.

85. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 78 do 84, označen s tem, da je R¹ terc.-butilna skupina.

86. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 78 do 85, označen s tem, da je R⁴ fenilna skupina.

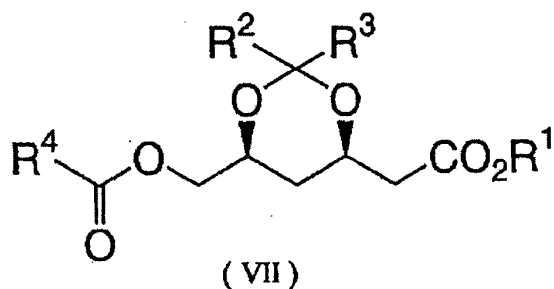
87. Proizvodni postopek po kateremkoli zahtevku od 78 do 86, označen s tem, da je vsak od R² in R³ metilna skupina.

88. Izolacijski/čistilni postopek, označen s tem, da obsega obdelovanje spojine, prikazane z naslednjo formulo (VI):



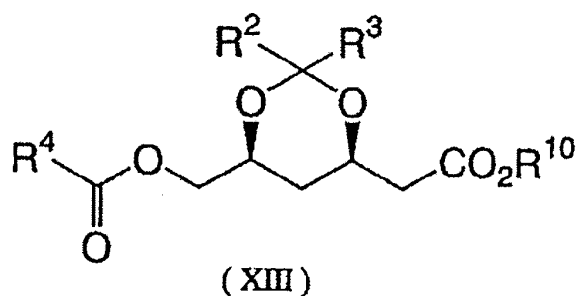
v formuli R¹ pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika in R⁴ pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika,

z reagentom, ki tvori acetal, v navzočnosti kislinskega katalizatorja, da jo tako pretvorimo v spojino, prikazano z naslednjo formulo (VII):

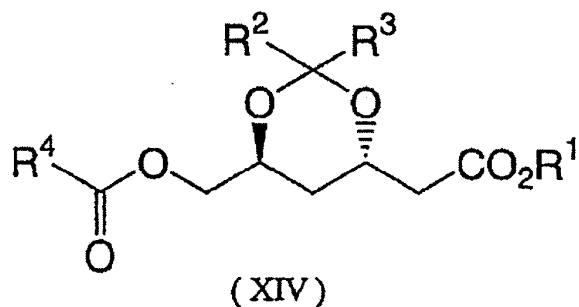


v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj, R^2 in R^3 vsak neodvisno pomeni vodik, alkilno skupino z 1 do 12 atomi ogljika, arilno skupino s 6 do 12 atomi ogljika ali aralkilno skupino s 7 do 12 atomi ogljika, in R^2 in R^3 lahko skupaj tvorita obroč, obdelovanje spojine, kontaminirane z nečistočo in prikazane z zgornjo formulo (VII), z alifatskim ogljikovodikovim topilom, da odstranimo nečistočo, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (VII), in pridobivanje spojine, prikazane z zgornjo formulo (VII), v kristalni obliki.

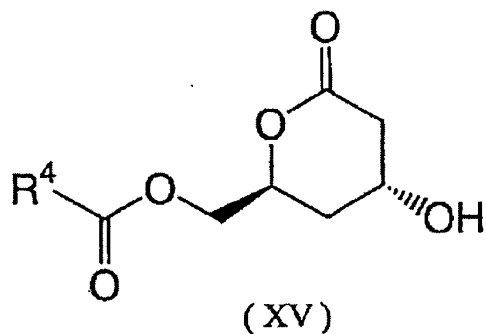
89. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 88, označen s tem, da je nečistoča, ki kontaminira spojino, prikazano z zgornjo formulo (VII), vsaj ena spojina, izbrana iz skupine, ki jo sestavljajo: spojina, prikazana z naslednjo formulo (XIII):



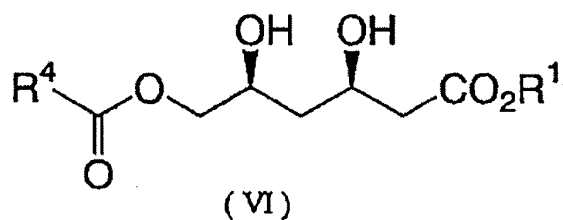
v formuli so R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj, in R^{10} pomeni nižjo alkilno skupino in je različen od R^1 , diastereomer, prikazan z naslednjo formulo (XIV):



v formuli so R^1 , R^2 , R^3 in R^4 , kot je definirano zgoraj,
spojina, prikazana z naslednjo formulo (XV):



v formuli je R^4 , kot je definirano zgoraj,
in spojina, prikazana z naslednjo formulo (VI):



v formuli sta R^1 in R^4 , kot je definirano zgoraj.

90. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 88 ali 89, označen s tem, da je alifatsko ogljikovodikovo topilo pentan, heksan, metilcikloheksan, heptan, oktan ali izooktan.

91. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 88 do 90, označen s tem, da kristalizacijo izvedemo z dodatno uporabo pomožnega topila, pri čemer topilo uporabimo za izboljšanje vsaj enega parametra izmed topnosti, dobitka,

obdelovalne koncentracije, učinka čiščenja in fizikalnih lastnosti kristalov spojine, prikazane z zgornjo formulo (VII), ki jih lahko dobimo.

92. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 91, označen s tem, da pomožno topilo uporabimo v taki količini, da masno razmerje pomožnega topila in alifatskega ogljikovodikovega topila (pomožno topilo/alifatsko ogljikovodikovo topilo) ni večje od 1 pri dokončanem postopku kristalizacije.

93. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 91 ali 92, označen s tem, da je pomožno topilo vsaj ena vrsta, izbrana iz skupine, ki jo sestavljajo toluen, etil acetat, metil terc.-butil eter in metilen klorid.

94. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 88 do 93, označen s tem, da aminsko sol, sestavljeno iz kisline in amina, uporabimo kot kislini katalizator.

95. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 94, označen s tem, da aminsko sol pripravimo in uporabimo *in situ*.

96. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 94 ali 95, označen s tem, da je kislina klorovodikova, bromovodikova, žveplova, metansulfonska, benzensulfonska, p-toluensulfonska ali trifluoroocetna kislina.

97. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 94 do 96, označen s tem, da je amin terciarni amin.

98. Izolacijski/čistilni postopek po zahtevku 97, označen s tem, da je terciarni amin trietilamin, N-metilmorfolin, diizopropiletilamin, piridin, 2-metilpiridin, 3-metilpiridin ali imidazol.

99. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 94 do 98, označen s tem, da amin uporabimo v prebitni količini glede na kislino.

100. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 88 do 99, označen s tem, da je reagent, ki tvori acetal, 2,2-dimetoksipropan.

101. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 88 do 100, označen s tem, da je R^1 terc.-butilna skupina in je R^{10} metilna skupina.

102. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 88 do 101, označen s tem, da je R^4 fenilna skupina.

103. Izolacijski/čistilni postopek po kateremkoli zahtevku od 88 do 102, označen s tem, da vsak od R^2 in R^3 pomeni metilno skupino.