

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-205**
 (22) Přihlášeno: **01.05.2001**
 (30) Právo přednosti: **09.05.2000 GB 0011120.3**
 (40) Zveřejněno: **12.02.2003**
(Věstník č. 2/2003)
 (47) Uděleno: **14.07.2011**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **24.08.2011**
(Věstník č. 34/2011)
 (86) PCT číslo: **PCT/GB2001/001915**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/085975**

(11) Číslo dokumentu:

302 675

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
C07C 69/675 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C07D 319/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

EP 0569998; WO 97/00968.

Patel R.N. et al.: „Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl ester“, Enzyme and Microbial Technology, Vol. 15(2), 1014-1021, 1993; Peters J. et al.: „Studies on the distribution and regulation of microbial keto ester reductases“, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 38, 334-340, 1992 (1992-12).

(73) Majitel patentu:

AstraZeneca UK Limited, London, W1Y 6LN, GB

(72) Původce:

Holt Robert Antony, Billingham, GB
 Blacker Andrew John, Huddersfield, GB
 Reeve Christopher David, Billingham, GB

(74) Zástupce:

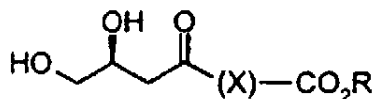
Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

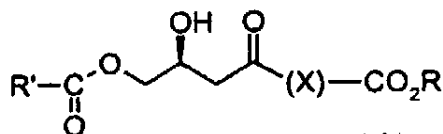
Způsob přípravy hydroxyesteru

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy hydroxyesteru obecného vzorce 4, jehož podstata spočívá v tom, že se sloučenina obecného vzorce 2 esterifikuje v přítomnosti sloučeniny R'-O-COR' a enzymu lipázy nebo hydrolázy za vzniku sloučeniny obecného vzorce 4, kde X znamená případně substituovanou uhlovodíkovou spojovací skupinu, R a R' každý nezávisle jeden na druhém znamená případně substituovanou uhlovodíkovou skupinu a R' znamená případně substituovanou uhlovodíkovou skupinu.



(2)



(4)

CZ 302675 B6

Způsob přípravy hydroxyesteruOblast techniky

5

Vynález se týká stereoselektivního způsobu přípravy hydroxyesteru.

Dosavadní stav techniky

10

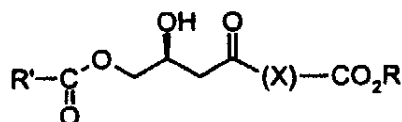
Mikrobiální redukce ethylesteru kyseliny 3,5-dioxo-6-(benzyloxy)hexanové k získání kyseliny 3,5-dihydroxy-6-(benzyloxy)hexanové je popsána v patentovém dokumentu EP 0 569 998 a v Enzyme and Microbial Technology, 1993, sv. 15, 1014 až 1021 (Patel a j.). Mikrobiální redukce 6-kyano-5-hydroxy-3-onhexanoátů k získání odpovídajících alkyl-6-kyano-3,5-dihydroxyhexanoátů je popsána v mezinárodní přihlášce WO 97/00 968.

15

Podstata vynálezu

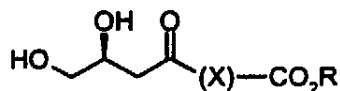
20

Předmětem vynálezu je způsob přípravy dihydroxyesteru obecného vzorce 4



(4)

jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje esterifikaci sloučeniny obecného vzorce 2



(2)

v přítomnosti sloučeniny $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ a enzymu lipázy nebo hydrolázy za vzniku sloučeniny obecného vzorce 4,

25

kde

X znamená případně substituovanou uhlovodíkovou spojovací skupinu,

30

R a R'' každý nezávisle jeden na druhém znamená případně substituovanou uhlovodíkovou skupinu a

R' znamená případně substituovanou uhlovodíkovou skupinu.

35

Výhodně R' znamená případně substituovanou alkylovou skupinu.

Výhodně R' znamená CH_3 , R znamená terc.butylovou skupinu a X znamená $-\text{CH}_2-$.

40

Výhodně R'' znamená vinylovou skupinu nebo isopropenyllovou skupinu.

Výhodně je enzym zvolen ze skupiny zahrnující prasečí pankreatickou lipázu, lipázu z Candida cylindracea, lipázu z Pseudomonas fluorescens, frakci B z Candida antarctica a lipázu z Humicola lanuginosa.

45

Uhlovodíkové skupiny ve významu symbolů X, R, R' nebo R'' mohou být substituovány jedním či více substituenty a mohou být per-substituovány, například perhalogenovány. Mezi příklady substituentů patří atomy halogenů, zejména atomy fluoru a chloru, alkoxy skupiny, jako jsou alkoxy skupiny obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, a oxoskupina.

Výhodně znamená symbol X skupinu obecného vzorce $-(CH_2)_n-$, kde n nabývá hodnot od 1 do 4, a nejvýhodněji znamená symbol X skupinu vzorce $-CH_2-$.

Symbol R'' může znamenat alkylovou skupinu, jako jsou alkylové skupiny obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, nebo alkykarbonylovou skupinu, jako jsou alkykarbonylové skupiny obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů v alkylové části, například skupinu $CH_3(C=O)-$ nebo $CF_3(C=O)-$. Nejvýhodněji symbol R'' znamená vinylovou skupinu nebo isopropenylovou skupinu.

Symbol R výhodně představuje alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, která může být lineární či rozvětvená a může být substituována jedním či více substituenty. Nejvýhodněji znamená symbol R terc.butylovou skupinu.

Symbol R' může znamenat substituovanou alkylovou skupinu, často alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, jako jsou skupiny CF_3- nebo CF_3CH_2- , avšak výhodně představuje nesubstituovanou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a nejvýhodněji methylovou skupinu.

Při stereoselektivní redukci sloučenin obecných vzorců 2 nebo 4 se výhodně používají chemické nebo mikrobiální redukční metody, jako jsou hydrogenace, transferová hydrogenace, redukce pomocí hydridů kovů nebo dehydrogenáz. Mezi příklady vhodných hydrogenačních způsobů, které jsou např. popsány v Helv. Chim. Acta 69, 803, 1986 (zde zahrnuto zmínkou) patří použití 0,01 až 10 % (hmotn./hmotn.) katalyzátoru, jako jsou platina, palladium nebo rhodium, na heterogenních nosičích, jako jsou uhlí, hliník, silika, s použitím molekulárního vodíku při tlaku mezi 100 a 1000 kPa, v rozpouštědle, jako jsou methanol, ethanol, terc.butanol, dimethylformamid, terc.butylmethylether, toluen nebo hexan. Alternativně lze použít homogenní hydrogenační katalyzátory, jako jsou katalyzátory popsané v EP 0 583 171 (zahrnutém zde zmínkou).

Mezi příklady vhodných chemických transferových hydrogenačních způsobů patří způsoby popsané v Zassinovich, Mestroni a Gladiali, Chem. Rev. 1992, 92, 1051 (zde zahrnuto zmínkou) nebo v Fuji a kol., J. Am. Chem. Soc. 118, 2521, 1996 (zde zahrnuto zmínkou). Při výhodných chemických transferových hydrogenačních způsobech se používají chirálně vázané komplexy přechodných kovů, jako jsou ruthenium nebo rhodium, zejména chirální diaminem vázané neutrální aromatické komplexy ruthenia. Výhodně se při takovém chemickém přenosu jako zdroj vodíku používá kyselina, zejména sůl kyseliny mravenčí, jako je triethylammonium-formiát.

Lze použít také činidla obsahující hydridy kovů, jako jsou činidla popsaná v Tet. 1993, 1997, Tet. Asymm. 1990, 1, 307, (zde zahrnuto zmínkou), nebo v J. Am. Chem. Soc. 1998, 110, 3560 (zde zahrnuto zmínkou).

Mezi příklady vhodných způsobů mikrobiální redukce patří podrobení sloučeniny obecného vzorce 2 nebo 4 působení organismu vykazujícího vlastnosti mikroorganismu zvoleného ze skupiny zahrnující organismy rodu Beauveria, výhodně druhu Beauveria bassiana, rodu Pichia, výhodně druhů Pichia angusta nebo Pichia pastoris, trehalophila, haplophila nebo membranefaciens, rodu Candida, výhodně druhů Candida humicola, solani, guillermoidii, diddenssiae nebo friedrichii, rodu Kluyveromyces, výhodně druhu Kluyveromyces fragilis, nebo rodu Torulaspora, výhodně druhu Torulaspora hanseni. Redukce lze dosáhnout podrobením sloučenin obecných vzorců 2 nebo 4 působení enzymů extrahovaných z výše uvedených mikroorganismů. Nejvýhodněji se sloučeniny obecných vzorců 2 nebo 4 podrobují působení mikroorganismu zvoleného ze skupiny zahrnující mikroorganismy druhů Pichia angusta, Pichia pastoris, Candida

guilliermondii, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosophilum* a *Torulospora hanseni*, nebo extraktu z výše uvedených organismů.

5 Předkládaný vynález se výhodně týká přípravy sloučeniny obecného vzorce 3 selektivní redukci sloučeniny obecného vzorce 2 pomocí celých buněk či extraktů výše uvedených mikroorganismů, výhodně ze skupiny zahrnující *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosophilum* a *Torulospora hanseni*.

10 Způsob podle předkládaného vynálezu se nejvýhodněji provádí pomocí celých buněk organismů, protože se tak lze vyhnout nutnosti separovat požadovaný enzym a poskytnou se kofaktory po reakci.

15 Lze použít libovolného z výše uvedených druhů, avšak při mnoha provedeních se ukázalo, že použitím enzymu nebo celých buněk mikroorganismu druhu *Pichia angusta* lze dosáhnout vysoké konverze a vysoké selektivity.

20 K řízení reakce se s enzymy obecně používá kofaktor, obvykle NAD(P)H (nikotinamid-adenin-dinukleotid či nikotin-amid-adenin-dinukleotid-fosfát), a systém pro regeneraci tohoto kofaktoru, například glukóza a glukózedehydrogenáza. Protože jsou v celých buňkách přítomny vhodné kofaktory a redukční mechanismy, je výhodné použití celých buněk v živném prostředí, které výhodně obsahuje vhodný zdroj uhlíku, což může zahrnovat jeden či více z následujících zdrojů: cukr, např. maltózu, sacharózu nebo výhodně glukózu, polyol, např. glycerol nebo sorbitol, kyselinu citronovou nebo nižší alkohol, například methanol nebo ethanol.

25 Pokud mají buňky během reakce růst, měly by být v živném prostředí obsaženy zdroje dusíku a fosforu a stopových prvků. Těmi zdroji mohou být zdroje běžně používané při kultivaci organismů.

30 Způsob lze provádět přidáním sloučeniny obecného vzorce 2 nebo 4 ke kultuře rostoucích organismů v prostředí, jež je schopné podporovat růst, nebo k suspenzi živých buněk v prostředí, které výhodně obsahuje zdroj uhlíku, které však postrádá jednu či více živin nutných pro růst. Lze také použít mrtvé buňky, a to za předpokladu, že jsou přítomné potřebné enzymy a kofaktory; pokud je to žádoucí, lze je k mrtvým buňkám přidat.

35 Pokud je to žádoucí, lze buňky imobilizovat na nosiči, který je v kontaktu se sloučeninou obecného vzorce 2 nebo 4, výhodně v přítomnosti vhodného zdroje uhlíku, jak je popsáno výše.

40 Hodnota pH se vhodně pohybuje mezi 3,5 až 9, například 4 až 9, výhodně čini nejvýše 6,5 a nejvýhodněji nejvýše 5,5. Velmi vhodně se použije pH v rozmezí 4 až 5. Způsob lze vhodně provádět při teplotě pohybující se mezi 10 až 50 °C, výhodně 20 až 40 °C a výhodněji 25 až 35 °C. Pokud se použijí živé celé buňky výše uvedených organismů, je výhodné pracovat za aerobních podmínek. Při výše uvedených hodnotách pH a teploty se vhodně použije intenzita provzdušnění ekvivalentní k 0,01 až 1,0 objemovým jednotkám vzduchu, měřeno při standardní teplotě a tlaku, na objemovou jednotku prostředí za minutu, avšak bude ceněno, že jsou možné značné změny.
45 Pokud růst organismů probíhá odděleně od způsobu, lze během něho použít podobné hodnoty pH, teploty a provzdušnění.

50 Purifikované enzymy lze izolovat známými způsoby, vhodně odstředováním suspenze rozpadlých buněk a separací čirého roztoku od buněčných zbytků, separací požadovaného enzymu z tohoto roztoku, například pomocí chromatografie s iontoměniči, vhodně pomocí eluce ze sloupce použitím kapaliny s rostoucí iontovou silou, nebo/a pomocí selektivní precipitace přidáním materiálu iontové povahy, například síranu amonného. Pokud je žádoucí vyšší čistota, lze tyto procedury opakovat.

Mikrobiální redukce sloučenin obecného vzorce 2 nebo 4 je obzvláště výhodná, a proto tento způsob představuje druhé provedení předkládaného vynálezu.

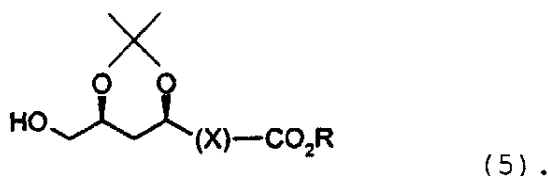
Při esterifikaci sloučenin obecného vzorce 2 nebo 3 je výhodné je transesterifikovat pomocí jiného esteru, který je přítomný alespoň v normální ekvivalenci, vzhledem k alkoholu, a je jím vhodně vinylester (jako vedlejší produkt se acetaldehyd nezúčastňuje zpětné reakce). Alternativně lze použít anhydrid, jako je acethanhydrid nebo anhydrid kyseliny trifluoroctové, nebo ester, jako je ethylacetát, nebo fluorovaný ester, jako je trifluorethylacetát. S výhodou se místně specifická esterifikační reakce provádí v organickém rozpouštědle obsahujícím méně než 1 % (hmotn./hmotn.) vody, jako jsou acetonitril, ethylacetát, tetrahydrofuran, terc.butylmethylether, toluen, butanon, pentanon či hexanon, při teplotě činící výhodně 20 až 75 °C, výhodněji 25 až 50 °C. Estery jsou výhodně estery nižších alkanových kyselin obsahujících 2 až 8 uhlíkových atomů nebo jejich substituované deriváty. Popřípadě lze použít inertní atmosféru, například lze roztokem probublávat proud dusíku.

Enzymy lze poskytovat jako takové nebo v podobě buněk je obsahujících. Je výhodné je imobilizovat, a tak usnadnit jejich separaci od produktu a, pokud je to žádoucí, jejich opětovné použití.

Mezi výhodné enzymy patří lipázy, jako jsou prasečí pankreatická lipáza, lipáza z *Candida cylindracea*, lipáza z *Pseudomonas fluorescens*, frakce B z *Candida antarctica*, dostupná např. pod ochrannou známkou Chirazyme L2, lipáza z *Humicola lanuginosa*, prodávána například pod ochrannou známkou Lipolase, nebo z *Pseudomonas*, prodávána například pod ochrannou známkou SAM II, a výhodněji z *Candida antarctica*, dostupná např. pod ochrannou známkou Chirazyme.

Sloučeniny obecného vzorce 1, ve kterém znamená symbol R' skupinu CH_3 , symboly R představuje popřípadě substituovanou uhlovodíkovou skupinu, X znamená skupinu $-(CH_2)_n-$ a n nabývá hodnot od 1 do 4, představuje třetí provedení předkládaného vynálezu. Výhodně představuje symbol R terc.butylovou skupinu a nejvýhodněji znamená symbol X skupinu $-CH_2-$.

Sloučeniny obecného vzorce 1 jsou použitelné jako meziprodukty pro přípravu farmaceutických sloučenin. Obvykle se ponechají reagovat s chránicí skupinou pro 1,3-dihydroxy skupiny, jako je 2,2-dimethoxypropan, za vzniku acetonidu, jak je popsáno v Synthesis 1998, 1713. Skupinu $R'-(C=O)-$ lze poté selektivně odstranit působením slabě bazického alkoholového roztoku, např. roztoku K_2CO_3 , jak je popsáno v US 5 278 313, nebo lipázy, buď ve vodném roztoku, nebo v organickém roztoku obsahujícím dostatečně vody pro podporu hydrolyzy, za vzniku sloučeniny obecného vzorce 5:



40 Příklady provedení vynálezu

45 Příklad 1

Příprava (3R,5S) terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu

Za míchání byla baňka s kulatým dnem o objemu 250 ml naplněna 20 ml acetonitrilu, 0,405 g (0,662 mmol) di-mu-chlorbis[(p-cymene)chlorruthenia (II)] a 0,492 g (1,34 mmol) (1S,2S)-(+)-

N-(4-toluensulfonyl)-1,2-difenyethylendiaminu. Roztok byl deoxygenován pomocí dusíku a následně udržováním jeho proudu. Deoxygenovaný roztok 26 g (0,119 mol) opticky čistého (5S)-terc.butyl-3-keto-5,6-dihydroxyhexanoátu v 15 ml acetonitrilu byl vložen do reakční nádoby a roztok byl míchán při teplotě místnosti po dobu 20 minut. Poté bylo po dobu 10 minut
 5 přidáváno 65 ml 5:2 (mol/mol) směsi destilované kyseliny mravenčí a triethylaminu a reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po dobu 48 hodin. K tomuto roztoku bylo pomalu přidáno 80 ml dichlormethanu a 120 ml nasyceného hydrogenuhličitanu sodného. K vodné vrstvě bylo přidáno 70 g chloridu amonného a organická vrstva byla oddělena. Vodná vrstva byla třikrát
 10 promyta 90 ml ethylacetátu, organické frakce byly smíchány, sušeny pomocí síranu sodného a bylo odstraněno rozpouštědlo za vzniku 21,1 g surového oleje obsahujícího převážně (3R,5S)-terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu. Poměr diastereomerů byl stanoven pomocí ¹³C-NMR a činil 5,2 : 1 (3R:5S) : (3S:5S). V další reakci byl materiál použit surový, avšak bylo možno ho purifikovat pomocí sloupcové chromatografie.

15 Příprava (3R,5S)-terc.butyl-6-acetoxy-3,5-dihydroxyhexanoátu

Do baňky s kulatým dnem o objemu 1 l bylo za míchání vloženo 700 ml tetrahydrofuranu a 70,7 g (0,32 mol) (3R,5S)-terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu, 41 ml (0,46 mol) vinylacetátu a 6,3 g lipázy Chirazyme L2™. Po 3 hodinách míchání při pokojové teplotě byla lipáza odstraněna
 20 prosetím a těkavé látky byly odstraněny destilací za vakua. Množství surového oleje činilo 78,7 g a bylo stanoveno, že hlavní složkou byl (3R,5S)-terc.butyl-6-acetoxy-3,5-dihydroxyhexanoátu. Tento materiál byl přímo použit v dalším stupni.

25 Příprava 1,1-dimethylethylesteru kyseliny (4R,6S)-6-[(acetyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-octové

Do baňky s kulatým dnem o objemu 1 l bylo za míchání vloženo 78,7 g (3R,5S) terc.butyl-6-acetoxy-3,5-dihydroxyhexanoátu, 800 ml 2,2-dimethoxypropanu a 5,7 g kyseliny p-toluen-sulfonové. Po 35 minutách byla reakční směs koncentrována na polovinu jejího objemu a bylo
 30 přidáno 300 ml dichlormethanu a 300 ml 1M hydrogenuhličitanu sodného. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla třikrát promyta 150 ml ethylacetátu. Organické frakce byly smíchány, sušeny pomocí síranu sodného a těkavé látky byly odstraněny destilací za vakua. Bylo získáno 92 g surového oleje. Tento byl nejprve purifikován průchodem krátkým sloupcem bleskové siliky a eluován hexanem a poté směsí hexan:ethylacetát 85:15 (obj./obj.), a poté třikrát krystalizací materiálu z hexanu za vzniku 22,17 g 1,1-dimethylethylesteru kyseliny (4R,6S)-6-[(acetyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-octové, který byl stanoven chirální GC ve výši 99,9 %.

40 Příprava 1,1-dimethylethylesteru kyseliny (4R,6S)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-octové

Do baňky s kulatým dnem o objemu 500 ml bylo za míchání vloženo 22,17 g 1,1-dimethylethylesteru kyseliny (4R,6S)-6-[(acetyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-octové, 250 ml methanolu a 5,05 g drceného uhličitanu draselného. Reakční směs byla míchána po dobu 35 minut až do dokončení hydrolýzy, poté byl přesetím odstraněn uhličitan draselný, reakční
 45 hmota byla koncentrována a bylo přidáno 150 ml 5% (hmotn./hmotn.) solanky a 150 ml toluenu. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla promyta dvakrát 250 ml toluenu. Organické vrstvy byly smíchány, třikrát promyty 15% (hmotn./hmotn.) solankou a rozpouštědlo bylo odstraněno pomocí vakuové destilace za vzniku 17,78 g čirého oleje, o němž bylo stanoveno, že jím je z >99% 1,1-dimethylethylesteru kyseliny (4R,6S)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-octové.
 50

Příklad 2

55 Příprava (5S) terc.butyl-6-acetoxy-5-hydroxy-3-ketohexanoátu

Za míchání byla baňka s kulatým dnem o objemu 250 ml naplněna 2,32 g (0,0106 mol) (5S)-terc.butyl-5,6-dihydroxy-3-ketohexanoátu, 40 ml tetrahydrofuranu, 0,98 ml (0,0106 mol) vinylacetátu a 0,22 g lipázy Chirazyme L2[™]. Po 20 minutách byla odstraněna lipáza přesetím a těkavé látky byly odstraněny destilací za vakua za vzniku 2,96 g surového oleje, který byl pomocí NMR charakterizován jako (5S)-terc.butyl-6-acetoxy-5-hydroxy-3-ketohexanoát.

Příklad 3

10 Příprava (3R,5S) terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu

Pichia angusta NCYC R230 (uložená dle ustanovení Budapešťské dohody 18. května 1995) byla kultivována v multifermentačním systému Braun Biostat Q v následujícím prostředí (na litr): glukóza, 40 g; MgSO₄, 1,2 g; K₂SO₄, 0,21 g; KH₂PO₄, 0,69 g; H₃PO₄ (koncentrovaná), 1 ml; kvasinkový extrakt (Oxoid), 2 g; FeSO₄·7H₂O, 0,05 g; odpěňovadlo (EEA 142 Foammaster), roztok stopových prvků, 1 ml (tento roztok obsahoval na litr): CuSO₄·5H₂O, 0,02 g; MnSO₄·4H₂O, 0,1 g; ZnSO₄·7H₂O, 0,1 g; CaCO₃, 1,8 g.

Každý ze čtyř fermenterů byl naplněn 250 ml média a byl sterilizován pomocí autoklávování. Hodnota pH byla upravena na 4,5 pomocí 7M roztoku hydroxidu amonného, teplota byla nastavena na 28 °C, tok vzduchu byl nastaven na 300 ml/minuta a rychlost míchání na 1200 otáček za minutu. Fermentery byly naočkovány buňkami z agarových desek (2% agar) obsahujících stejné médium, jako je médium popsané výše, kromě toho, že koncentrace glukózy činila 20 g/litr. Po 22 hodinách růstu ve fermenterech byla nastartována bioredukční reakce přidáním (5S)-terc.butyl-3-keto-5,6-dihydroxyhexanoátu; dva z fermenterů byly naplněny každý 3,75 ml a zbývající dva byly naplněny každý 5 ml.

V reakci bylo pokračováno po dalších 78 hodin až do 100% konverze substrátu. Během tohoto období byla kultivace zásobena 50% roztokem glukózy při rychlosti 1 až 3 gramy glukózy/litr kultury/hodina pro zachování životaschopnosti buněk a pro poskytnutí zdroje redukční síly. Reakce byly ukončeny odstraněním buněk odstředováním. K získanému supernatantu prostému buněk byl přidán chlorid sodný ke konečné koncentraci ve výši 20 % hmotn./obj. a směs byla extrahována třikrát úměrným objemem acetonitrilu. Smíchané acetonitrilové extrakty byly sušeny pomocí bezvodého síranu sodného a rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku na rotační odpařovače (teplota vodní lázně 45 °C) za zisku viskózního bledě žlutého oleje. Identita produktu z každé reakce byla potvrzena, jednalo se o (3R,5S)-terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoát a nadbytek diastereomeru u každého ze vzorků ukazuje tabulka uvedená níže.

Pokus	Nadbytek diastereomeru (%)
1	99,6
2	99,6
3	99,4
4	99,6

40 Příklad 4

Příprava (3R,5S) terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu

Pichia angusta NCYC R320 (uložená dle ustanovení Budapešťské dohody 18. května 1995) byla kultivována v multifermentačním systému Braun Biostat Q v následujícím prostředí (na litr): glukóza, 20 g; síran amonný, 10 g; kvasinkový extrakt (Oxoid), 2 g; MgSO₄·7H₂O, 1,2 g;

KH_2PO_4 , 0,69 g; K_2SO_4 , 0,21 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g; H_3PO_4 (koncentrovaná), 1 ml; odpěňovadlo (EEA 142 Foammaster), 0,5 ml; roztok stopových prvků, 1 ml (tento roztok obsahoval na litr): $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, 2,85 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,075 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g; kyselina sírová (koncentrovaná), 1 ml).

5

Jeden fermenter byl naplněn 250 ml média a byl sterilizován pomocí autoklávování. Hodnota pH byla upravena na 5,0 pomocí 2M roztoku hydroxidu sodného. Teplota byla nastavena na 28 °C, tok vzduchu byl nastaven na 250 ml/minuta a rychlost míchání na 1200 otáček za minutu. Fermenter byl naočkován 2,5 ml suspenze buněk ve sterilní deionizované vodě připravené buňkami z agarové desky s *Pichia angusta* NCYC R320. Po 17 hodinách růstu byla nastartována bio-redukce přidáním 6,36 g (5S)-terc.butyl-3-keto-5,6-dihydroxyhexanoátu v podobě vodného roztoku. Ve stejném čase bylo započato s dodáváním glukózy do fermentoru při rychlosti 2 g glukózy na litr za hodinu.

10

V reakci bylo pokračováno po dalších 78 hodin, kdy bylo dosaženo 96% konverze substrátu. Výchozí materiál a produkt byl stanovován pomocí HPLC (sloupec Hichrom S5 CN-250A, teplota 35 °C, mobilní fáze: vodný roztok kyseliny trifluoroctové (TFA) (0,1%):acetonitril 95:5, rychlost toku 1 ml.min⁻¹, injekční objem 5 ml, detektor indexu lomu).

15

Reakce byla ukončena odstraněním buněk odstředováním při 4000 x g po 20 minut. Hodnota pH získaného supernatantu prostého buněk byla upravena na 7,5 pomocí 2M NaOH. V supernatantu prostém buněk byl rozpuštěn $\text{MgSO}_4 \cdot 1,6\text{H}_2\text{O}$ (15 % hmotn./obj. na základě bezvodého) a výsledný roztok byl dvakrát extrahován úměrným objemem 2-pentanonu. Fáze rozpouštědla byly shromážděny a rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku na rotační odpařovače při 45 °C za výtěžku oranžového viskózního oleje. Tento byl opětovně rozpuštěn v 50 ml suchého, destilovaného 2-pentanonu a rozpouštědlo bylo opět odstraněno na rotační odpařovače za zisku terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu (5,08 g, 80% izolovaný výtěžek). Byl stanoven nadbytek diastereomeru, a to následovně; vzorek terc.butyl-3,5,6-trihydroxyhexanoátu (30 mg) byl derivatizován alespoň 10 minut při pokojové teplotě reakcí v nadbytku anhydridu kyseliny trifluoroctové, nadbytek anhydridu byl odstraněn za proudu suchého dusíku a zbylý olej byl zředěn dichlormethanem (1 ml). Vzorek byl analyzován pomocí sloupce Chiralcel Dex CB (25 metrů) při teplotě 140 °C (isotermická). Diastereomery byly eluovány za 14,4 minut (3R,5S-diastereomer) a 15,7 minut (3S,5S-diastereomer). Tímto způsobem byl zjištěn nadbytek diastereomeru ve vzorku, který činil 99,7 %.

25

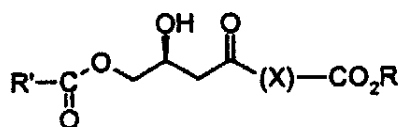
30

35

PATENTOVÉ NÁROKY

40

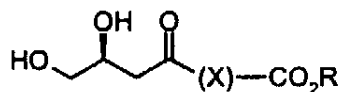
1. Způsob přípravy dihydroxyesteru obecného vzorce 4



(4)

45

v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje esterifikaci sloučeniny obecného vzorce 2



(2)

v přítomnosti sloučeniny $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ a enzymu lipázy nebo hydrolázy za vzniku sloučeniny obecného vzorce 4,

kde

X znamená případně substituovanou uhlovodíkovou spojovací skupinu,

R a R'' každý nezávisle jeden na druhém znamená případně substituovanou uhlovodíkovou skupinu a

R' znamená případně substituovanou uhlovodíkovou skupinu.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že R' znamená případně substituovanou alkylovou skupinu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že R' znamená CH_3 , R znamená terc.butylovou skupinu a X znamená $-\text{CH}_2-$.

4. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že R'' znamená vinylovou skupinu nebo isopropenylovou skupinu.

5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, **v y z n a ě n ý t í m**, že enzym je zvolen ze skupiny zahrnující prasečí pankreatickou lipázu, lipázu z *Candida cylindracea*, lipázu z *Pseudomonas fluorescens*, frakci B z *Candida antarctica* a lipázu z *Humicola lanuginosa*.

Konec dokumentu
