

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 159397 B



(21) Patentansøgning nr.: 3257/82

(22) Indleveringsdag: 20 jul 1982

(41) Alm. tilgængelig: 22 jan 1983

(44) Fremlagt: 08 okt 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 jul 1981 JP 114038/81

(51) Int.Cl.⁵ C 12 P 17/06
C 12 P 7/62
// C 07 D 309/30

(71) Ansøger: *SANKYO COMPANY LIMITED; 1-6 3-chome; Nihonbashi Honcho; Chuo-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Akira *Terahara; JP, Minoru *Tanaka; JP

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af kolesterol syntese-inhiberende derivater af forbindelserne
ML-236B lacton og ML-236B carboxylsyre

(56) Fremdragne publikationer

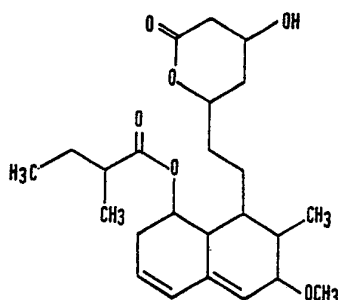
og den tilsvarende fri hydroxycarboxylsyre og salte og estere af syren fremstilles ved enzymatisk alkoxylering af en ML-236B forbindelse under anvendelse af en mikroorganisme af slægten Syncephalastrum, Absidia eller Cunninghamella, f.eks. Absidia coerulea, eller en cellefri, enzymholdig ekstrakt af den pågældende mikroorganisme. Herefter omdannes lactonen eller carboxylsyren på almindelig måde til saltet eller esteren.

(57) Sammendrag:

Forbindelserne er lægemidler, der er i stand til at hæmme biosyntesen af kolesterol.

3257-82

6-methoxy-IsoML-236B lacton med formelen:

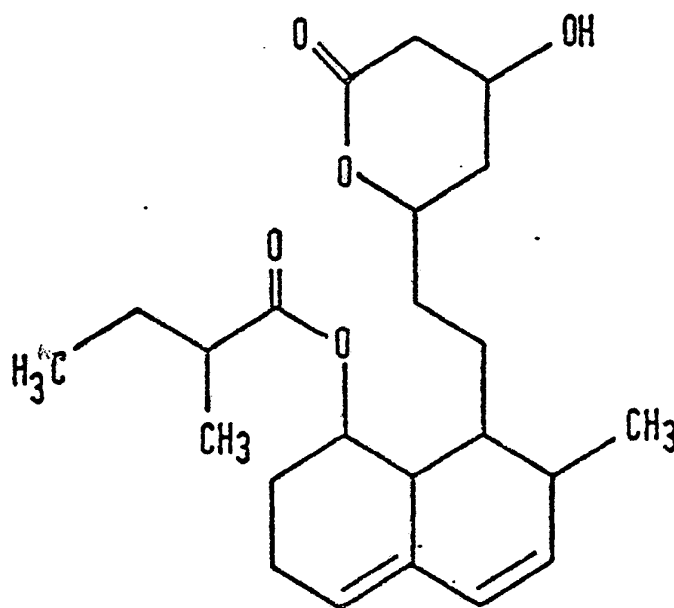


I

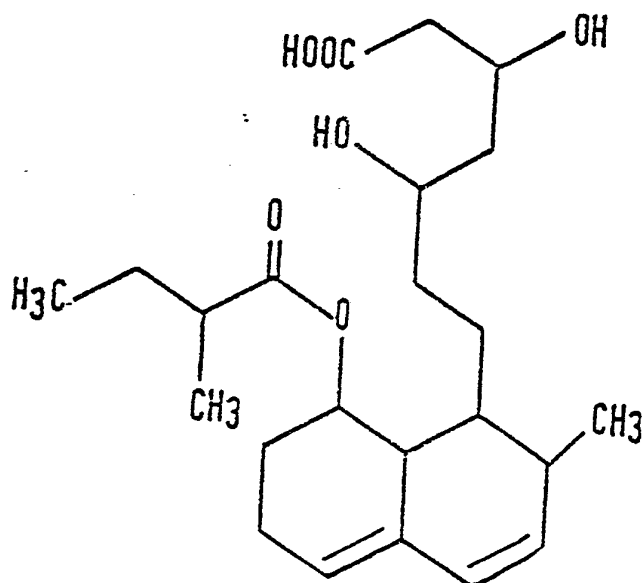
DK 159397 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en række hidtil ukendte derivater af forbindelserne ML-236B som defineret i krav 1's indledning, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

5 ML-236B er omhandlet i US-patentskrift nr. 3 983 140, og udtrykket "ML 236B" anvendes til omtale af to forbindelser, en lacton benævnt "ML-236B lacton", der har formelen:

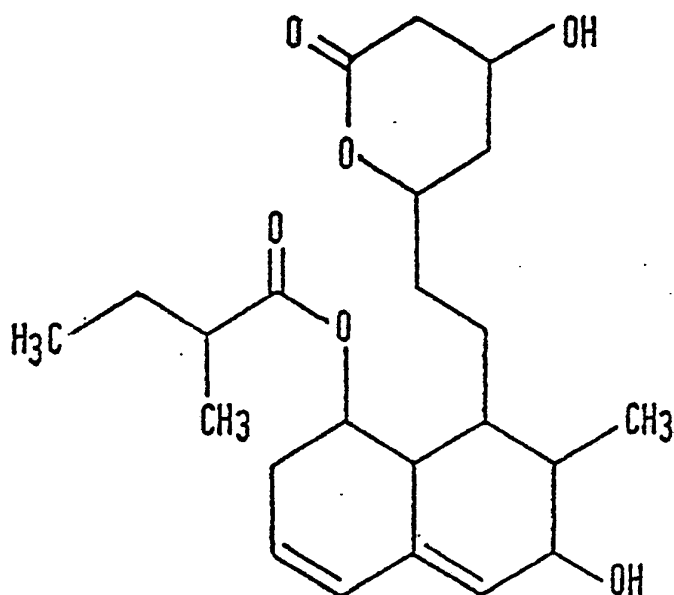


og den tilsvarende frie hydroxycarboxylsyre benævnt "ML-236B carboxylsyre", der har formelen:



Disse ML-236B forbindelser er blevet isoleret og rensat ud fra stofskifteprodukter fra mikroorganismer af slægten *Penicillium*, specielt *Penicillium citrinum*, en art af blåskimmel. De har vist sig at hæmme kolesterolbiosyntesen af enzymer eller dyrkede celler isoleret fra forsøgsdyr ved at konkurrere med det hastighedsbegrænsende enzym, der er aktivt ved kolesterolbiosyntesen, dvs. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A-reductase, og som et resultat heraf reducerer de signifikant serumkolesterolniveauerne hos dyr (*Journal of Antibiotics*, 29, 1346 (1976)).

En række forbindelser, der strukturelt er beslægtet med ML-236 B, er også blevet opdaget, og visse har vist sig at have samme evne til at hæmme kolesterolbiosyntesen. Blandt de ML-236B derivater, der er blevet opdaget, er den bedste omhandlet i engelsk patentskrift 2 077 264. I lactonformen kan disse forbindelser afbildes med formlen:



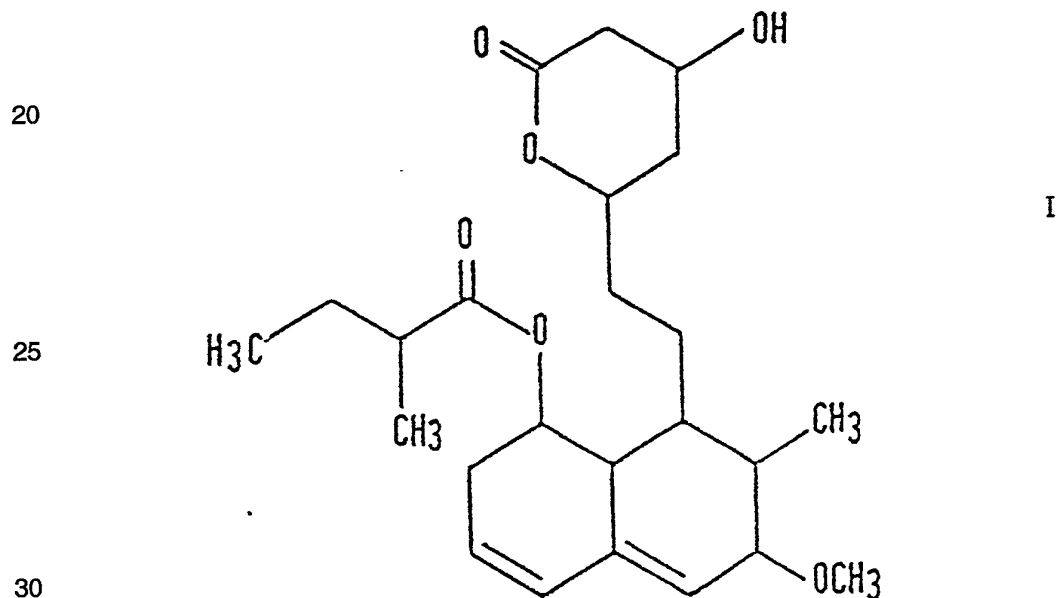
15 og de er blevet betegnet IsoM-4 lacton og IsoM-4' lacton
afhængigt af den specielle konfiguration ved de forskel-
lige asymmetriske carbonatomer, der findes i molekylet.
Den tilsvarende IsoM-4-carboxylsyre og IsoM-4'-carboxyl-
syre er også omhandlet, og disse forbindelser fandtes al-
20 le at være i stand til at hæmme kolesterolbiosyntesen.

IsoM-4- og IsoM-4'-forbindelserne og deres alkalimetal-
salte kan fremstilles ved enzymatisk hydroxylering af Ml-
236B eller et derivat heraf, og andre salte og estere kan
25 naturligvis herefter fremstilles ved almindelig saltdan-
nelse eller esterificering, idet der går ud fra det frem-
stillede hydroxyleringsprodukt. Den enzymatiske hydroxy-
lering udføres fortrinsvis under anvendelse af en passen-
de mikroorganisme eller et enzymholdigt ekstrakt af disse
30 mikroorganismer, skønt den også kan udføres som en del af
pattedyrsmetabolismen af Ml-236B eller under anvendelse
af lever- eller et enzymholdigt ekstrakt af leveren fra
disse dyr. Foretrukne mikroorganismer til denne metode er
mikroorganismer af slægterne Absidia, Cunninghamella,
35 Syncephalastrum, Mucor, Pycnoporus eller Rhizotonia.

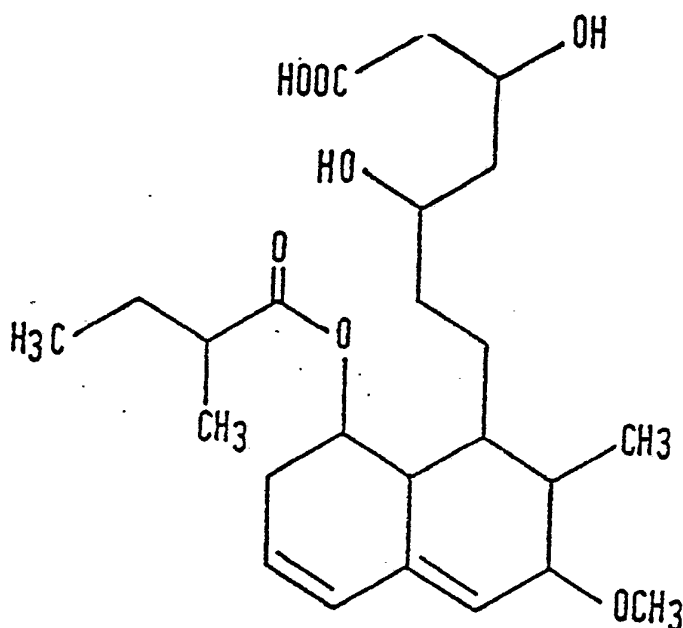
Det har nu overraskende vist sig, at behandlingen af ML-236B-lacton eller ML-236B carboxylsyre eller et salt eller en alkylester heraf med visse af disse mikroorganismer eller med enzymholdige ekstrakter heraf også kan fremstille andre specielle, men beslægtede forbindelser, der ligeledes har vist sig i stand til at hæmme cholesterolbiosyntesen.

Herudover nedbrydes de omhandlede forbindelser med større besvær efter administrering end ML-236B. De omhandlede forbindelser mister derfor ikke så let aktiviteten, hvorfor de har en mere vedvarende virkning, med medfølgende fordele, der vil være velkendt inden for fagområdet.

Forbindelserne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er lactonen med formelen I:



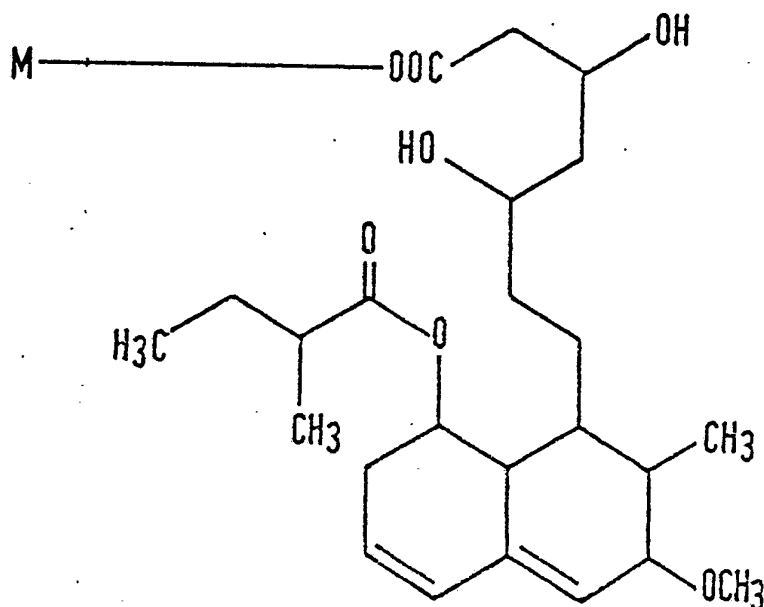
såvel som dens tilsvarende fri hydroxy-carboxylsyre, der kan afbildes med formelen II:



og farmaceutisk acceptable alkalimetalsalte eller C_1 - C_4 -alkylestere af syren.

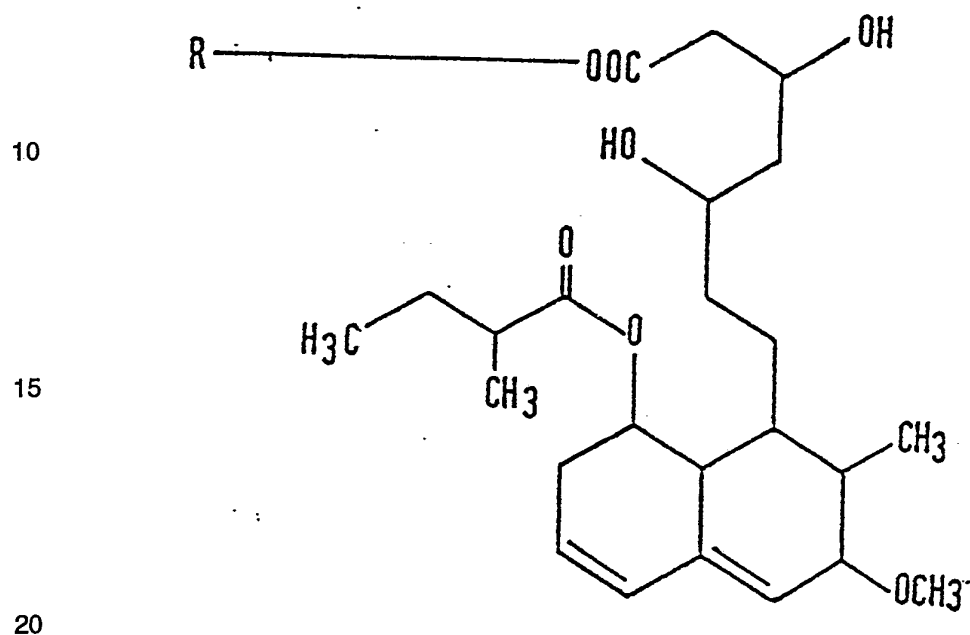
Forbindelsen med formlen I omtales som 6-methoxy-IsoML-236B lacton, og forbindelsen med formlen II omtales som 6-methoxy-IsoML-236B carboxylsyre, idet saltene og estrene benævnes i overensstemmelse hermed.

Alkalimetalsaltene af 6-methoxy-IsoML-236B carboxylsyre kan afbildes med formel III:



hvor M betyder et alkalimetallatom specielt natrium eller kalium.

Esterne af 6-methoxy-IsoML-236B carboxylsyre har formelen V:



hvor R betegner alkoholdelen af en ester.

R kan være en lige eller forgrenet gruppe såsom methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, isobutyl- eller n-butyl.

De omhandlede forbindelser har vist sig at hæmme cholesterolbiosyntesen i leveren, og de kan således anvendes ved behandlingen af hypercholesteræmi eller forhindre arteriosclerose på samme måde som de forbindelser, der er omhandlet i engelske patentskrifter nr. 2 075 013 og nr. 2 077 264.

De hæmmende virkninger af visse af de omhandlede forbindelser udtrykt som koncentrationen i $\mu\text{g/ml}$, der er nødvendig for at hæmme cholesterolbiosyntesen med 50 %

(målt ved metoden beskrevet i Journal of Biological Chemistry, 234, 2835 (1959)), er følgende:

6-methoxy-IsoML-236B lacton 0,015
5 Natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat 0,0044.

10 Til sammenligning er værdien for ML-236B lacton 0,010 µg/ml, der er sammenlignelig med de niveauer, der opnås med de omhandlede forbindelser, men som tidligere bemærket er aktiviteten af de her omhandlede forbindelser på grund af deres modstandsdygtighed mod in vivo nedbrydning betydeligt længere varende.

15 De omhandlede forbindelser kan administreres på sædvanlig måde, f.eks. parenteralt (f.eks. subcutant, intravenøst eller intramuskulært) eller peroralt, (f.eks. i form af tabletter, kapsler, pulvere eller granuler). Daglig dosis til en voksen patient vil naturligvis variere, afhængigt af patientens alder, legemsvægt og tilstand såvel som ad-
20 ministreringsvejen og hyppigheden, men sædvanligvis administreres de omhandlede forbindelser i en mængde på fra 0,5 til 500 mg/dag for voksne i en enkelt dosis eller i opdelte doser, fortrinsvis 3 eller 4 gange om dagen.

25 Den omhandlede enzymatiske alkoxyleringsfremgangsmåde udføres fortrinsvis ved at bringe M-236B lacton, ML-236B carboxylsyre eller et alkalimetalsalt eller en C₁-C₄-alkylester af syren (i det efterfølgende sammenfattende omtalt som "ML236B forbindelsen") i kontakt med en mikro-
30 organisme af slægten Syncephalastrum, Absidia eller Cunninghamella, der er i stand til at omdanne ML-236B forbindelsen til den ønskede omhandlede forbindelse, eller ved at bringe ML-236B forbindelsen i kontakt med en enzymholdig ekstrakt af mikroorganismen og herefter ad-
35 skille den omhandlede forbindelse fra dyrkningssubstratet eller reaktionsblandingen.

Foretrukne mikroorganismer er *Syncephalastrum racemosum* IFO-4814 (NRRL 12562), *Syncephalastrum racemosum* IFO-4828 (NRRL 12563), *Absidia coerulea* IFO-4423 (NRRL 12560) og *Cunninghamella echinulata* IFO-4445 (NRRL 12561). Disse mikroorganismer er alle frit tilgængelige under ovennævnte deponeringsnumre uden begrænsninger indtil mindst år 2011 fra Agricultural Research Culture Collection, USA.

Den ønskede omdannelse kan opnås ved at kontakte helcelle mikroorganismer eller i visse tilfælde cellefri ekstrakter af mikroorganismerne med ML-236B forbindelsen. Den fremstillede form af forbindelsen vil afhænge af dyrkningsbetingelserne og af den anvendte form for mikroorganismen. Dersom for eksempel helcelle mikroorganismen dyrkes i nærværelse af ML-236B forbindelsen, kan den opnåede forbindelse være carboxylsyren, lactonen, C_1 - C_4 -alkylesteren eller alkalimetalsaltet afhængigt af dyrkningsbetingelserne, specielt pH-værdien. Hvis derimod ML-236B forbindelsen blot bringes i kontakt med et hvilende cellesystem eller med en cellefri ekstrakt, er den omhandlede forbindelse, der opnås, oftest i form af alkalimetalsaltet.

Omdannelsens fremadskriden kan følges ved at udtage prøver af reaktionsblandingen under reaktionsforløbet og bestemme omdannelsesgraden.

Dersom mikroorganismerne skal dyrkes i nærværelse af ML-236B forbindelsen for at frembringe de omhandlede forbindelser, udvælges dyrkningsbetingelserne og dyrkningssubstratet specielt med henblik på den pågældende mikroorganisme, der skal dyrkes. Da de arter af mikroorganismer, der er foreslået anvendt ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er velkendte, er også dyrkningsbetingelser og dyrkningssubstrater, der skal anvendes til disse mikroorganismer, velkendte.

De omhandlede forbindelser kan skilles fra reaktionsblanding på almindelig måde, f.eks. ved affiltrering af cellerne (dersom nødvendigt) og herefter underkaste den tilbageblevne blanding en hvilken som helst kombination af tyndtlagskromatografi, søjlekromatografi eller high performance væskechromatografi. De forskellige omhandlede forbindelser eller forskellige isomere af omhandlede forbindelser, dersom to eller flere fremstilles samtidigt, kan eventuelt adskilles fra hinanden i løbet af en eller flere af de kromatografiske rensningstrin, eller de kan fraskilles som en blanding.

Når den omhandlede enzymatiske alkoxyleringsfremgangsmåde frembringer 6-methoxy-IsoML-236B carboxylsyre eller 6-methoxy-IsoML-236B lacton, kan disse omdannes ved almindelige kemiske reaktioner til de tilsvarende alkalimetalsalte eller C_1 - C_4 -alkylestere (hvor det drejer sig om carboxylsyren, kan denne eventuelt først omdannes til lactonen). F.eks. kan metalsaltene (dvs. forbindelserne med formel III) fremstilles ved fremgangsmåden beskrevet i engelsk patentskrift nr. 1 555 831 til fremstilling af salte af ML-236B carboxylsyre.

C_1 - C_4 -alkylestere af 6-methoxy-ML-236B carboxylsyre (dvs. forbindelser med formel V) kan fremstilles ved esterificering af 6-methoxy-IsoML-236B lactonen eller carboxylsyren således som beskrevet i engelsk patentskrift nr. 1 555 831 for fremstillingen af estere af ML-236B carboxylsyre, dvs. enten ved omsætning af 6-methoxy-IsoML-236B forbindelsen med en alkohol i nærværelse af en passende katalysator eller ved omsætning af forbindelsen med en diazoforbindelse, fortrinsvis diazomethan eller en C-substitueret diazomethan.

Opfindelsen beskrives nærmere i de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1Fremstilling af 6-methoxy-IsoML-236B lacton

5 Tyve 500 ml Erlenmeyer-kolber, der hver indeholder 100 ml
 substrat, der har den nedenfor beskrevne sammensætning,
 podedes med sporer af Absidia coerulea IFO-4423. Kolberne
 rystedyrkedes ved 26 °C og 220 rystninger pr. minut i 4
 dage. Herefter tilsattes ML-236B lacton til hver af kol-
 10 berne til en slutkoncentration på 0,05 vægt/rumfangspro-
 cent. Dyrkningen fortsattes ved 26 °C og 220 rystninger
 pr. minut i yderligere 6 dage.

Sammensætningen af substratet var (procenterne er vægt/-
 15 rumfang):

	Glucose	2,0 %
	K ₂ HPO ₄	0,15 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15 %
20	NH ₄ NO ₃	0,1 %
	Pepton	0,1 %
	Majsstøbevæske	0,2 %
	Gærekstrakt	0,1 %
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 %
25	Postevand	resten
	(Indstillet til pH 7,0)	

Efter at dyrkningen var afsluttet, frafiltrerendes reak-
 tionsvæsken, og filtratet indstilledes med trifluored-
 30 dikesyre til pH 3. Den fremstillede blanding ekstra-
 heredes med tre 1 liters portioner ethylacetat, hvorved
 der opnåedes ekstrakter, der indeholdt 6-methoxy-IsoML-
 236B carboxylsyre.

35 Ekstrakterne sloges sammen og vaskedes herefter med en

mættet vandig opløsning af natriumchlorid og tørredes over vandfrit natriumsulfat, hvorefter en katalytisk mængde trifluoreddikesyre sættes til for at lactonisere. Den opnåede blanding vaskedes herefter med en 5 vægt/rum-
5 fangsprocent vandig opløsning af natriumbicarbonat, tørredes over vandfrit natriumsulfat og inddampedes til tørhed under reduceret tryk. Remanensen rensedes ved hjælp af kromatografi gennem en Lobar-søjle (Merck Si 60, størrelse A), der elueredes med en 7:3 rumfangsblanding ben-
10 zen og acetone, hvorved der opnåedes 23 mg 6-methoxy-IsoML-236B lacton.

6-methoxy-IsoML-236B lactonen havde følgende fysiske egenskaber:

1. Det kernemagnetiske resonansspektrum, målt ved 90 MHz
15 i deuteriochloroform under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard, var følgende, δ ppm:

6,15 (1H, doublet)
5,70 (1H, kvartet)
5,70 (1H, multiplet)
20 5,40 (1H, multiplet)
4,60 (1H, multiplet)
4,40 (1H, multiplet)
3,45 (1H, doublet)
3,30 (3H, singlet).

25 2. Infrarødt absorptionsspektrum (methanol) $\lambda_{\max}$ nm:
235.

3. Infrarødt absorptionsspektrum (tynd film) $\nu_{\max}$ cm⁻¹:
3450, 1730.

4. Massespektrum m/e:
30 420 (M⁺), 402, 318, 300, 286, 268.

5. Tyndtlagskromatografi:

Plade: Merck silicagel Art 5715:

Opløsningsmiddel: benzen/acetone (1:1 rumfang):

Rf-værdi: 0,7.

6. Elementaranalyse:

- 5 Beregnet for $C_{24}H_{36}O_6$: C 68,54% - H 8,63%.
Fundet : C 68,53% - H 8,81%.

EKSEMPEL 2

Fremstilling af natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat

- 10 1 g 6-methoxy-IsoML-236B lacton opløstes i en ringe mængde acetone, og 13 ml af en 0,2N vandig opløsning af natriumhydroxid sættes til den fremstillede opløsning. Blandingen henstod 1 time ved 40°C for at muliggøre hydrolyse. Efter reaktionen var løbet til ende, afdestilleredes acetonen fra reaktionsblandingen, og den fremkomne remanens vaskedes
15 med 5 ml chloroform. Den vandige fase indstilledes til en pH-værdi på 8,0 ved tilsætning af 0,1N saltsyre. Fraktionen, der indeholdt det pågældende natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat, absorberedes på en dianion HP-20 søjle (et præparat fra Mitsubishi Chemical Industries Co.). Fraktionen
20 indeholdende natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat elueredes herefter med 50 rumfangsprocent vandig acetone. Acetonen afdestilleredes eluatet, og remanensen frysetørredes, hvorved der opnåedes 1,003 g af det pågældende natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat.

- 25 Natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat har følgende fysiske egenskaber:

1. Det kernemagnetiske resonansspektrum, målt ved 60 MHz i deuteromethanol under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard, var følgende, δ ppm:

- 3,31 (3H, singlet)
 5,42 (1H, multiplet)
 5,70 (1H, multiplet)
 5,71 (1H, kvartet)
 5 6,12 (1H, doublet).

2. Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol) $\lambda_{\max}^{\text{nm}}$:
 235.

3. Infrarødt absorptionsspektrum (tynd film) vcm^{-1} :
 3400, 2950, 1580.

10 4. Elementaranalyse:

Beregnet for $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{Na}$: C 62,61% - H 8,04%
 Fundet : C 62,54% - H 8,11%.

EKSEMPEL 3

Fremstilling af methyl-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat

- 15 1 g natrium-6-methoxy-IsoML-236B carboxylat opløstes i en
 ringe mængde methanol, og herefter syrnedes den fremstil-
 lede opløsning ved tilsætning af trifluoreddikesyre under
 afkøling. En støkiometrisk mængde af en etheropløsning af
 diazomethan tilsattes umiddelbart herefter, og blandingen
 20 henstod i 30 minutter. Herefter afdestilleredes opløs-
 ningsmidlet, og remanensen rensedes gennem en Lobar-søjle
 (Merck RP-8, størrelse B), der elueredes med en 6:4 rum-
 fangsblending af methanol og vand, hvorved der opnåedes
 780 g af det ønskede methyl-6-methoxy-IsoML-236B carboxy-
 25 lat som en farveløs olie, der havde følgende fysiske egen-
 skaber:

1. Det kernemagnetiske resonansspektrum, målt ved 60 MHz i
 deuterochloroform under anvendelse af tetramethylsilan som
 den indre standard, var følgende, δ ppm:

- 3,30 (3H, singlet)
 3,60 (3H, singlet)
 4,37 (1H, multiplet)
 4,62 (1H, multiplet)
 5 5,30 (1H, multiplet)
 5,70 (1H, multiplet)
 5,71 (1H, kvartet)
 6,13 (1H, doublet)

2. Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol) $\lambda_{\max}$ nm:
 10 235.

3. Infrarødt absorptionsspektrum (tynd film) $\nu_{\max}$ cm⁻¹:
 3400, 1725.

4. Massespektrum:
 Det anvendte instrument var af typen D-300, fremstillet af
 15 Nippon Electronics, og målingen foretoges, efter at forbindelsen var silyleret med N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, m/e: 668 (M⁺).

5. Elementaranalyse:
 Beregnet for C₂₅H₄₀O₇: C 66,34% - H 8,91%
 20 Fundet : C 66,38% - H 8,98%.

EKSEMPEL 4

Fremstilling af 6-methoxy-IsoML-236B lacton

Tyve 500 ml Erlenmeyer-kolber, der hver indeholdt 100 ml af et substrat, der havde den nedenfor beskrevne sammensætning,
 25 podedes med sporer af Absidia coerulea IF0-4423. Kolberne rystedyrkedes herefter ved 220 rystninger pr. minut og 26°C i 4 dage. Efter afslutning af denne periode tilsattes methyl ML-236B carboxylat til en slutkoncentration på 0,05 vægt/rumfangsprocent. Dyrkningen fortsattes yderligere 6 dage
 30 ved 26°C og 220 rystninger pr. minut.

Sammensætningen af substratet var (procenterne er vægt/rumfang):

	Glucose	2,0%
	K ₂ HPO ₄	0,15%
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15%
	NH ₄ NO ₃	0,1%
	Pepton	0,1%
	Majsstøbevæske	0,2%
	Gærekstrakt	0,1%
10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001%
	Postevand	Resten
	(indstilles til pH 7,0)	

Efter dyrkningen var afsluttet, behandlede reaktionsvæsken som beskrevet i eksempel 1, hvorved der opnåedes 11 mg 6-methoxy-IsoML-236B lacton, der havde de samme fysiske egenskaber som forbindelsen fremstillet i eksempel 1.

EKSEMPEL 5

Fremstilling af 6-methoxy-IsoML-236B lacton

Fremgangsmåden i eksempel 1 gentoges, bortset fra at der anvendtes sporer af Syncephalastrum racemosum IFO-4814 i stedet for Absidia coerulea IFO-4423. Der opnåedes 5 mg af den ønskede 6-methoxy-IsoML-236B lacton.

EKSEMPEL 6

Fremstilling af 6-methoxy-IsoML-236B lacton

Fremgangsmåden beskrevet i eksempel 1 gentoges, bortset fra at sporer af Cunninghamella echinulata IFO 4445 anvendtes i stedet for Absidia coerulea IFO-4423. Der opnåedes 3 mg af den ønskede 6-methoxy-IsoML-236B lacton.

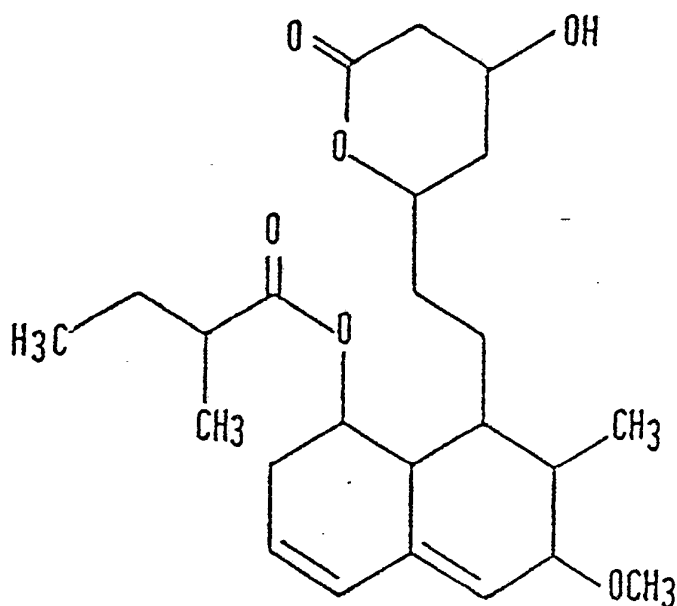
EKSEMPEL 7Fremstilling af 6-methoxy-IsoML-236B lacton

Tyve 500 ml Erlenmeyer-kolber, der hver indeholdt 100 ml af et substrat, der havde samme sammensætning som angivet i eksempel 1, podedes med sporer af *Absidia coerulea* IF0-4423. Herefter dyrkedes kolberne under omrystning ved 26°C i 4 dage og med 220 omrystninger pr. minut. De fremstillede klumper af mikroorganismer opsamledes ved centrifugering, der vaskedes med fysiologisk saltvand og centrifugeredes atter. Herefter opslæmmedes i 1,8 liter af en 0,1 M phosphatpufferopløsning (pH 7,0). Herefter tilsattes natrium-ML-236B carboxylat og glucose til suspensionen til en slutkoncentration på henholdsvis 0,05% og 0,2%. Kulturen holdtes under omrystning i yderligere 5 dage ved 26°C og 220 omrystninger pr. minut. Herefter filtreredes reaktionsvæsken, og der behandledes som beskrevet i eksempel 1, hvorved opnåedes 8 mg 6-methoxy-IsoML-236B lacton.

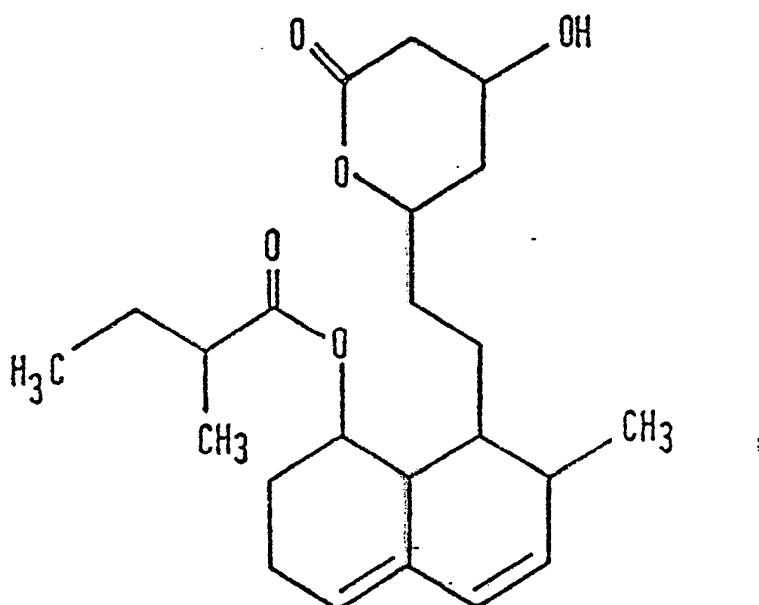
P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en lacton med formel

I:



eller den tilsvarende fri hydroxycarboxylsyre eller
dennes alkalimetalsalte eller C₁-C₄ alkylestere, k e n
d e t e g n e t ved, at man enzymatisk methoxylerer en
ML-236B forbindelse med formlen



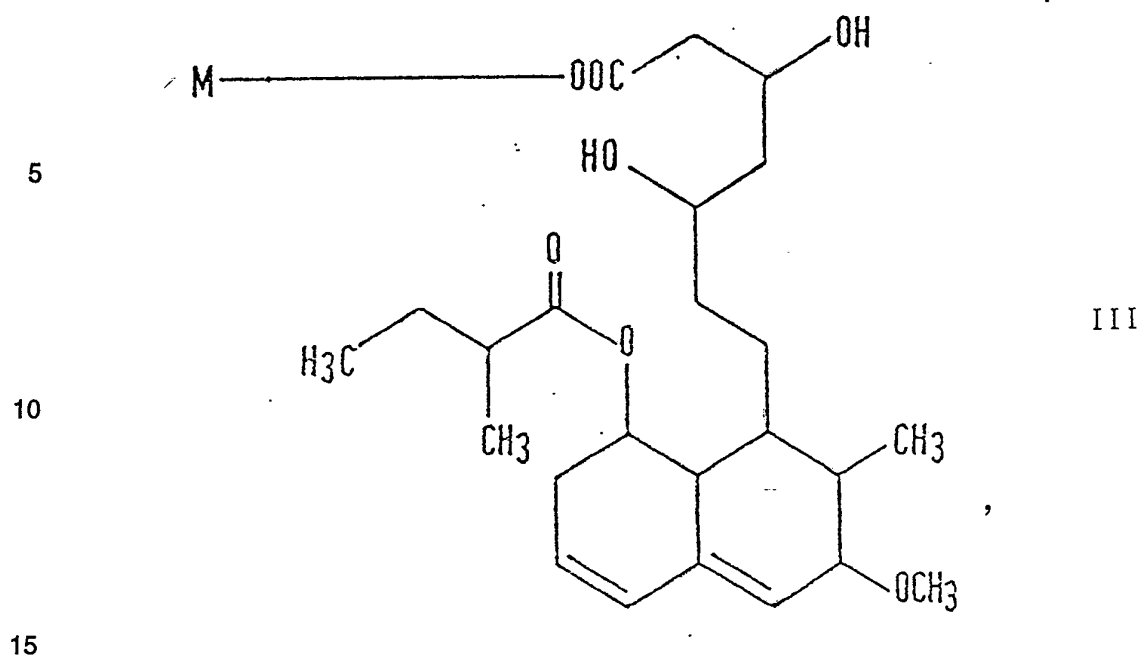
den tilsvarende fri hydroxycarboxylsyre eller dennes alkalimetalsalte eller C_1 - C_4 -alkylestere, ved at kontakte den med en mikroorganisme af slægten *Syncephalastrum*, *Absidia* eller *Cunninghamella*, eller med en cellefri, enzymholdig ekstrakt af en sådan mikroorganisme, hvorpå en dannet lacton med formel I eller en dannet tilsvarende fri carboxylsyre om ønsket omdannes til et alkalimetalsalt eller en C_1 - C_4 alkylester på i og for sig kendt måde.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er *Syncephalastrum racemosum* IFO-4814 (NRRL 12562), *Syncephalastrum racemosum* IFO-4828 (NRRL 12563), *Absidia coerulea* IFO-4423 (NRRL 12560) eller *Cunninghamella echinulata* IFO-4445 (NRRL 12561).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er *Absidia coerulea* IFO-4423 (NRRL 12560).

4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at en forbindelse med formel I eller dens tilsvarende fri hydroxycarboxylsyre fraskilles reaktionsblandingen, og at der herefter salt-dannes eller esterificeres til fremstilling af et salt eller en ester af syren.

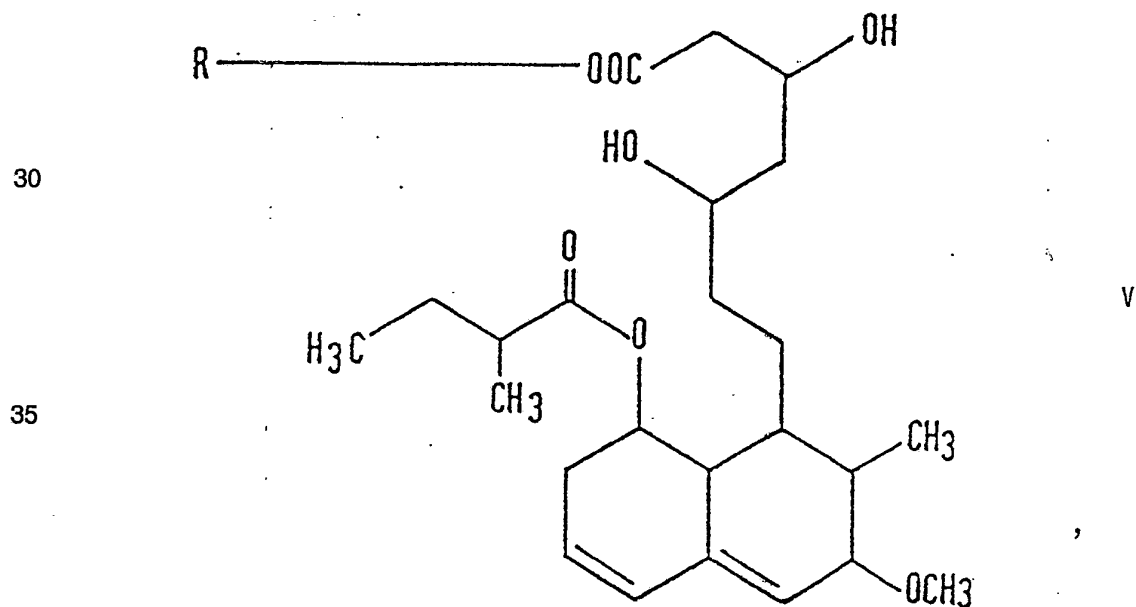
5. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at der fremstilles en forbindelse med formel III



hvor M betyder et alkalimetallatom.

20 6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendet tegnet ved, at M betegner natrium eller kalium.

7. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-4, kendet tegnet ved, at der fremstilles en
25 forbindelse med formel V:



hvor R betyder C_1 - C_4 -alkyl.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t
ved, at R betegner en methylgruppe.

5

10

15

20

25

30

35