

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 7/26

C12P 7/28 C07C 45/45

C07C 49/245



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00817089.4

[43] 公开日 2003 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 1409768A

[22] 申请日 2000.12.13 [21] 申请号 00817089.4

[30] 优先权

[32] 1999.12.13 [33] AU [31] PQ4625

[86] 国际申请 PCT/AU00/01543 2000.12.13

[87] 国际公布 WO01/44486 英 2001.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.13

[71] 申请人 维多利亚科技大学

地址 澳大利亚维多利亚

共同申请人 波利奇普医药有限公司

[72] 发明人 安德鲁·J·斯莫尔里奇

莫里斯·A·特里怀拉

凯利·A·威尔金森

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

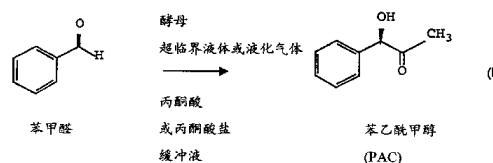
代理人 张平元 范明娥

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 以酵母为基础生产 L-PAC 的工艺

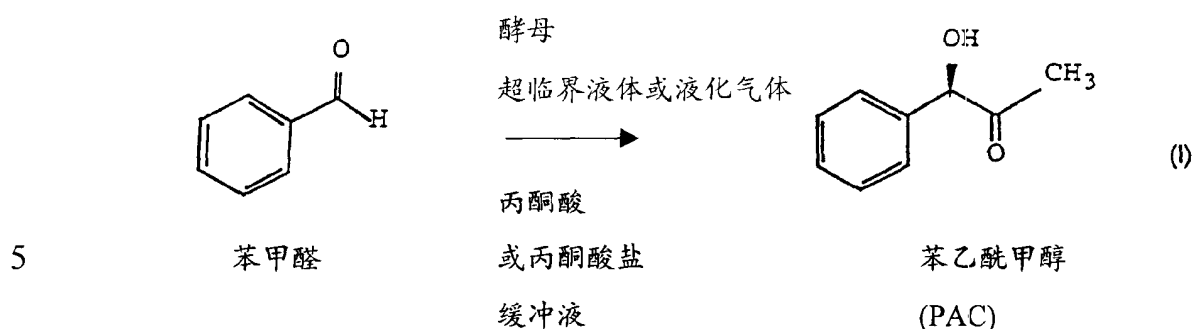
[57] 摘要

本发明提供取代或者未取代甲醇化合物的合成方法，包括以下步骤：在(a)超临界流体或者(b)液化气体的存在下，将相应的取代或者未取代芳香醛进行酵母介导的酮醇缩合，并回收甲醇化合物。优选酵母是酿酒酵母。在一个特别优选实施方案中，芳香醛是苯甲醛，甲醇是苯乙酰甲醇按照反应(I)：其中苯甲醛、丙酮酸或者两者均可任选被取代。



ISSN 1008-4274

- 1.一种合成取代或者未取代甲醇化合物的方法,包括在:
 - (a)超临界流体, 或者
 - (b)液化气体存在下, 将相应的取代或者未取代芳香醛进行酵母介导的醇酮缩合并回收甲醇化合物的步骤。
- 2.如权利要求1的方法, 其中酵母为酿酒酵母。
- 3.如权利要求1或2的方法, 其中酵母特别适用于超临界流体环境或者用于提高醇酮缩合的效率。
- 4.如权利要求1-3之一的方法, 其中酵母与反应物保持最大表面积的接触。
- 5.如权利要求1-4之一的方法, 其中所述缩合在一种或多种液化气体存在下进行, 其中液化气体选自二氧化碳、甲烷、乙烷、乙烯、丙烷、丁烷和液化石油气。
- 6.如权利要求1-4之一的方法, 其中缩合在超临界流体存在下进行,并用超临界流体或有机溶剂萃取反应混合物来回收甲醇化合物。
- 7.如权利要求5的方法, 其中超临界流体选自二氧化碳、乙烷、一氧化二氮、氙、三氟甲烷、一氟甲烷、六氟化硫和氯三氟甲烷。
- 8.如权利要求7的方法, 其中超临界流体为二氧化碳。
- 9.如权利要求8的方法, 其中缩合在33-42℃的温度下进行。
- 10.如权利要求9的方法, 其中缩合在35℃的温度下进行。
- 11.如权利要求8-10之一的方法, 其中缩合在1500-2500 psi的压力下进行。
- 12.如权利要求9的方法, 其中缩合在2500 psi的压力下进行。
- 13.如权利要求1-12之一的方法, 其中缩合在副产物形成抑制剂的存在下进行。
- 14.如权利要求3的方法, 其中抑制剂为乙醇。
- 15.如权利要求1-14之一的方法, 其中芳香醛为苯甲醛且甲醇为苯乙酰甲醇, 按如下进行反应:



其中苯甲醛, 丙酮酸或两者均任选被取代。

16.如权利要求15的方法, 其中苯甲醛被一种或多种烷基、芳基、卤素、硝基、羟基、烷氧基、氨基、羰基、硫氧基或硫代烷氧基基团或其组合所取代。

17.如权利要求15或16的方法, 其中丙酮酸盐/柠檬酸盐缓冲溶液的pH为5-6。

18.如权利要求1-17之一的方法, 其中将苯甲醛转化为苯乙酰甲醇, 采用0.6 -1.2 ml缓冲液/g, 酵母与底物的比例为4.2 g酵母/mmol苯甲醛。

19.如权利要求18的方法, 其中反应时间为3-24小时。

20.如权利要求15-19之一的方法, 其中超临界流体不是二氧化碳, 并采用可原位转化成丙酮酸的丙酮酸前体。

以酵母为基础生产L-PAC的工艺

5 本发明涉及用于合成多种产品尤其是药物化合物的有机化合物前体。本发明方法在超临界流体或液化气体存在下使用酵母-介导的催化作用，具体地说是酵母介导的丙酮酸盐(pyruvate)与取代芳香醛间的缩合反应，得到相应的醇酮(acyloin)(羟基酮)化合物。在一个优选实施方案中，丙酮酸盐与苯甲醛反应得到高对映体纯度的苯乙酰甲醇，即麻黄碱的前体。

10

发明背景

生产对映体纯化合物的物理化学方法通常包括多步合成步骤，同时还需一步或多步的不对称且繁复的纯化步骤。这些方法不仅耗时而且产率较低。可由某些对映体纯的起始物，进行对映选择性(enantioselective)反应步
15 骤；然而，市售化合物中符合要求的这种纯起始原料很少。

为了克服采用常规有机化学品时出现问题，已对生物系统进行了深入的研究。这种系统在反应中显示了高度的立体选择性，因此已对可与许多反应物完成特定反应步骤的微生物、酶或化学酶反应进行了研究。例如，多种微生物被建议用来合成 3-羟基丙酸的光学活性 α -取代衍生物，这些衍
20 生物可用作化合物例如 α -生育酚、麝香酮和药物、杀虫剂和农业化学药品合成的中间体(US4734367, Hoffman-La Roche公司)。大多数这类方法采用在水性介质中的全细胞发酵系统或者具有特定所需活性的分离酶。然而，发酵系统存在缺点，例如比较难于对所需产物进行纯化且产率降低；采用固化细胞或者经选择或遗传修饰的细胞，可提高产率和反应的便利性，但是这
25 显著提高了生产成本。使用纯化酶通常相当昂贵，但是不采用固定化酶则会使产率降低且难于纯化。

近年来对此进行了深入研究，试图开发出具有高选择性、高转化率且产物无需色谱分离和纯化的方法。通常这种反应需在有机溶剂中进行，因为这利于进行大规模反应和纯化。

30 干面包酵母可影响有机溶剂(例如己烷或苯)中 α -酮酯的非发酵还原，以产生具有较高产率和选择性的相应 α -羟基酯(Nakamura 等, 1988;

Nakamura 等, 1990; Nakamura 等, 1991; Nakamura 等, 1993); 也有人证实了石油醚、二乙醚、甲苯、四氯化碳和汽油中的 β -酮酯还原(Jayasinghe 等, 1993; Jayasinghe 等, 1994; North, 1996)。尽管最初认为, 对于催化反应所用的脱氢酶和还原酶而言, 酵母的固定(例如在聚氨酯中)是保持细胞膜结合辅酶稳定性所必须(Nakamura 等, 1988; Nakamura 等, 1990), 但后来发现向有机系统中加入少量水则不再需要固定(Nakamura等, 1991)。

最初从麻黄属植物中分离出来的麻黄素(α -[1-(甲氨基)乙基]苯-甲醇), 以天然异构体1-麻黄素、d-伪麻黄素以及其他药理活性异构体(包括d-麻黄素和1-伪麻黄素)的形式存在。这些化合物是肾上腺素能拟交感神经剂并具有抗组胺活性; 1-麻黄素广泛用作支气管扩张药, 而d-伪麻黄素用作解充血剂(decongestant)。许多处方和非处方药物制剂中均含有这类化合物。

采用水性介质中的全面包酵母细胞催化方法生产1-苯乙酰甲醇(1-麻黄素前体), 是一种商业首选的微生物生物转化方法(Neuberg和Hirsch, 1921; 也可参见Hildebrandt和Klavehn, 1934)。该反应涉及酵母-诱导的苯甲醛与乙酰辅酶A 缩合。已对该方法进行了广泛的研究, 并证明它可被丙酮酸脱羧酶介导(Groger, Schmander和Mothes, 1966)。研究表明该反应对底物有相对广谱的特异性, 可以使许多取代芳香醛转化成具有光学活性的相应取代苯乙酰甲醇(Long, James和Ward, 1989)。

尽管广泛利用这种酵母-催化的系统, 但是它通常采用不便于大规模萃取和纯化的水性系统, 这种酵母催化系统需要采用有机溶剂。另外, 发酵系统存在缺点, 例如所需产物的纯化比较困难且产率降低; 采用固化细胞或者经选择或遗传修饰的细胞, 可提高产率和反应的便利性, 但是这显著提高了生产成本。使用纯化酶通常相当昂贵, 但是不采用固定化酶则会使产率降低且难于纯化。

在我们的早期国际申请PCT/AU99/00433中, 我们公开了采用非发酵酵母在有机溶剂中进行酵母介导的苯甲醛醇酮缩合。向反应混合物中加入少量乙醇和降低反应温度, 可抑制副产物的形成。采用有机溶剂会产生与毒性有关的问题, 例如职业保健和安全性问题, 同时也存在易燃性和废料的处理/再循环问题。

我们惊奇地发现, 可在超临界或液化二氧化碳或液化石油气中进行酵母介导的苯香醛的醇酮缩合(acyloin condensation)。该反应使芳香醛向所需

甲醇转化的转化率增高。在一个优选实施方案中，采用本发明方法所得的产率约为79%，且没有副产物。

更令人惊奇的是，液态或超临界形式的二氧化碳会钝化还原反应，这样就抑制了副产物的形成。

- 5 由于二氧化碳无毒且利于回收，该方法避免了与包含有机溶剂的反应有关的问题。

也可采用其他超临界流体，但是它们在未加抑制剂时可能无法抑制副产物的形成，并且可能没有同样的环保优势。

10 发明简述

第一方面，本发明提供取代或者未取代甲醇化合物的合成方法，包括以下步骤：在(a)超临界流体，或者(b)液化气体的存在下，将相应的取代或者未取代芳香醛进行酵母介导的醇酮缩合，并回收甲醇化合物。

- 15 可采用任何能产生醇酮缩合反应的酵母。采用最便宜的市售酵母和普通的面包酵母、优选为酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*)，可降低生产成本。也可采用其他用途的酵母菌株，这包括酿造酵母和葡萄酒或雪利酒酵母。可采用特别适于超临界流体环境或者能提高醇酮缩合效率的菌株；这种菌株包括通过常规方法选择和遗传修饰的菌株。

- 20 为了获得最大的反应效率，可将酵母与反应物保持最大表面积的接触。这可采用活性"干酵母"完成，其市售产品为"速干酵母"，并可在室温贮藏。另外，可采用粉碎的干面包酵母。也可采用其他酵母，例如US4734367中描述的酵母，或者例如Chenevert 等(1992)公开的真菌。按在此描述的方法，本领域技术人员会很容易地确定适于本发明目的的任何特定生物体。

超临界流体可以是临界温度低于50℃的任何适宜超临界流体。

- 25 当在适当提高温度(适宜的地为33-42℃，优选35℃)条件下进行反应时，我们发现二氧化碳特别适宜。在这些温度下，相应的压力为1500-2500磅/平方英寸(psi)，优选为1500 psi。

其他适宜的已知超临界流体，例如：

液体	临界温度 (°C)	临界压力 (psi)
乙烷	32.4	707.8
一氧化二氮	36.6	1050
氙	16.7	847
三氟甲烷(CHF ₃)	26.3	705
一氟甲烷	42	812.2
六氟化硫	45.7	545.3
氯三氟甲烷	29	561.3

当在超临界流体下进行缩合时，可经超临界流体或有机溶剂例如乙酸乙酯或二乙醚萃取，从反应混合物中回收甲醇化合物。

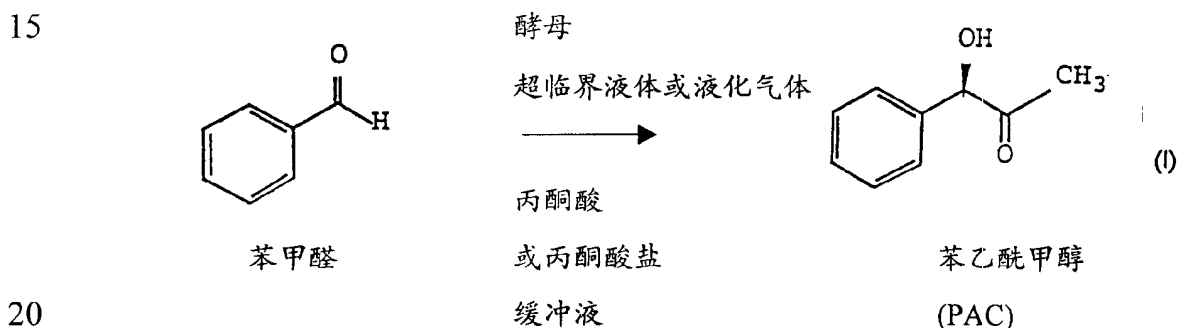
液化气体可以是二氧化碳、碳氢化合物(例如甲烷、乙烷、丙烷、丁烷、
5 乙烯等)，或者它们的混合物。也可采用液化石油气。

采用在此描述的方法，本领域技术人员会容易地确定适于本发明目的
的特定超临界流体，并确定反应的适宜温度和压力。

本领域技术人员也会容易地确定能有效抑制副产物形成的特定超临界
流体或液化气体，并能决定是否需要加入适宜的抑制剂。我们的在先国际
10 申请PCT/AU99/00433中论述了乙醇为适宜的抑制剂。

当酵母介导的反应完成时，将系统脱气并用超临界流体或有机溶剂萃
取酵母。

在一个优选实施方案中，本发明提供了苯甲醛经酵母介导转化成苯乙
酰甲醇的方法，即按下述反应：



很容易理解的是，苯甲醛、丙酮酸或者两者均可任选被取代，并且丙
酮酸盐例如丙酮酸钠可替换丙酮酸。另外，如果超临界流体或液化气体不
是二氧化碳，则可采用能原位转化成丙酮酸的丙酮酸前体例如乳酸。经烷

基、芳基、卤素、硝基、氢氧基、烷氧基、氨基、羰基、硫氧基或硫代烷氧基或其组合取代的芳香醛也可用来替换苯甲醛。

对于丙酮酸钠或丙酮酸，丙酮酸盐/柠檬酸盐缓冲溶液的pH优选为5-6，更优选为pH 6。优选采用0.6-1.2 ml 缓冲液/g 酵母，以达到最佳效果。

5 酵母与底物的比例范围取决于具体的系统，这很容易经常规实验和误差方法确定，我们发现 4.2 g酵母/mmol苯甲醛的比例可获得最佳的苯乙酰甲醇转化率；提高酵母用量会使转化率有所增加，较低的酵母用量提供较低的转化率。

10 同样地，最佳反应时间也很容易确定，我们对苯甲醛-苯乙酰甲醇系统的反应时间(3-24小时)进行了考察。反应时间超过24小时并不会导致更高的产率。

本发明反应方法明显快于已有方法，甚至快于那些也使用了酵母的方法。该方法中所用的超临界流体或液化气体可以回收利用。回收的酵母(尤其是采用二氧化碳为流体或气体时)可用于其他目的，例如用作动物饲料。

15

发明详述

下面的非限定性实施例将对本发明作详细描述。

实施例 1:

20 采用丙酮酸钠的酵母介导的苯甲醛醇酮缩合

将苯甲醛(0.010 g, 0.1 mmol)、丙酮酸钠(0.205 g)、面包酵母(0.415 g)和柠檬酸盐缓冲液(0.415 ml, pH 6)置于15 ml 不锈钢容器中。经HPLC 泵将无水液态二氧化碳泵入容器，将容器加压至2000 psi，并于33℃水浴中搅拌24小时。然后将反应容器冷却至室温和缓慢脱气。用二乙醚将容器内容物和
25 残余物洗涤3 次并过滤。

气相色谱分析表明形成了82%的苯乙酰甲醇。

混合物用径向色谱法提纯(石油醚：二乙醚(70:30))，得到纯1-PAC。

$[\alpha]_D = -377.7$ ($c = 0.006$, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3)

30 δ 7.30-7.55, m, Ph; δ 5.15, s, CH; δ 2.10, s, CH_3 。

实施例 2:

采用丙酮酸钠的酵母介导的苯甲醛醇酮缩合

将苯甲醛(0.010 g, 0.1 mmol)、丙酮酸钠(0.205 g)、面包酵母(0.415 g)和柠檬酸盐缓冲液(0.415 ml, pH 6)置于15 ml 不锈钢容器中。经HPLC 泵将无水液态二氧化碳泵入容器, 将容器加压至2000 psi, 并于33℃水浴中搅拌4
5 小时。然后将反应容器冷却至室温和缓慢脱气。用二乙醚将容器内容物和残余物洗涤3 次并过滤。

气相色谱分析表明62%转化成苯乙酰甲醇。

混合物用径向色谱法提纯(石油醚: 二乙醚(70 : 30)), 得到纯1-PAC。

$[\alpha]_D = -377.7$ ($c = 0.006$ CHCl₃)

10 文献: $[\alpha]_D = -408.7$ ($c = 1.1$ CHCl₃)

Takeshita, M.和 Sato, T., *Chem.Pharm.Bull.*1989, 37, 1085。

¹H NMR (CDCl₃)

δ 7.30-7.55 m, Ph; δ 5.15, s, CH; δ 2.10, s, CH₃。

在不同温度和压力下进行上述反应4小时, 得到以下转化率的1-PAC:

压力→ 温度↓	1500 psi	2000 psi	2500 psi
33	63%	62%	38%
35	68%	45%	79%
38	47%	41%	76%
42	10%	12%	36%

15

实施例 3: 比较数据

以下为超临界流体系统(采用二氧化碳)与我们在先申请公开的有机溶剂系统间的比较。

	超临界流体 (CO ₂)	有机溶剂
转化率	79%	32%
时间	4 小时	24 小时
g 酵母/ mmol 苯甲醛	4.2	5
ml 缓冲液/g 酵母	1	1
g 丙酮酸钠/ mmol 苯甲醛	2	2.5
温度	35℃	5℃
压力	2500 psi	N/A

实施例 4:在超临界二氧化碳中反应

- 将苯甲醛(0.137g, 1.3 mmol)、丙酮酸钠(2.168 g, 19.7mmol)、柠檬酸盐
5 缓冲液(5.4 ml, pH 6)和酵母(5.4 g)和置于250ml 不锈钢压力容器中。将无水
液态二氧化碳泵入容器, 将容器加压至1500 psi。然后将容器于35℃水浴中
搅拌3小时。3小时后, 将反应容器冷却至室温和缓慢脱气。用二乙醚将容
器内容物和残余物洗涤3 次并过滤。气相色谱分析表明84%转化成苯乙酰
甲醇。手性气相色谱(GC)分析表明比例为87 : 13, 74% ee。
- 10 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.30-7.55, m, Ph ; δ 5.15, s, CH ; δ 2.10, s, CH_3 。

实施例 5:在液态二氧化碳中反应

- 将苯甲醛(0.137g, 1.3 mmol)、丙酮酸钠(2.1685 g, 19.7mmol)、柠檬酸
15 盐缓冲液(5.4 ml, pH 6)和酵母(5.4 g)和置于250ml 不锈钢压力容器中。将无
水液态二氧化碳泵入容器, 将容器加压至1500 psi。然后将容器于35℃水浴
中搅拌3小时。3小时后, 将反应容器缓慢脱气。用二乙醚将容器内容物和
残余物洗涤3 次并过滤。气相色谱分析表明84%转化成苯乙酰甲醇。手性GC
分析表明比例为95 : 5, 90% ee。

20

实施例 6:采用丙酮酸的酵母介导的苯甲醛醇酮缩合(a)在超临界二氧化碳中反应

- 将苯甲醛(0.137g, 1.3 mmol)、酵母(5.4g)加上丙酮酸(0.216g, 2.45 mmol)
25 与水(5.4ml)的混合物(用醋酸铵缓冲至pH = 5.45)置于250ml不锈钢压力容
器中。将无水液态二氧化碳泵入容器, 将容器加压至1500 psi。然后将容器于
35℃水浴中搅拌3小时。3小时后, 将反应容器冷却至室温并缓慢脱气。用
二乙醚将容器内容物和残余物洗涤3 次并过滤。气相色谱分析表明44%转
化成苯乙酰甲醇。手性GC分析表明比例为96 : 4, 92% ee。

- 30 (b)在液态二氧化碳中反应

将苯甲醛(0.137g, 1.3 mmol)、酵母(5.4g)加上丙酮酸(0.216g, 2.45 mmol)

与水(5.4ml)的混合物(用醋酸铵缓冲至 $\text{pH} = 5.45$)置于250ml不锈钢压力容器中。将无水液态二氧化碳泵入容器,将容器加压至1500 psi。然后将容器于 35°C 水浴中搅拌3小时。3小时后,将反应容器缓慢脱气。用二乙醚将容器内容物和残余物洗涤3次并过滤。气相色谱分析表明51%转化成苯乙酰甲
5 醇。手性GC分析表明比例为97:3, 94% ee。

(c)在液化石油气中反应

将苯甲醛(0.137g, 1.3 mmol)、酵母(5.4g)加上丙酮酸(0.216g, 2.45 mmol)与水(5.4ml)的混合物(用醋酸铵缓冲至 $\text{pH} = 5.45$)置于250ml不锈钢压力容器中。将液化石油气(LPG)泵入容器,将容器加压至100 psi。然后将容器于室
10 温搅拌24小时。24小时后,将反应容器缓慢脱气。用二乙醚将容器内容物和残余物洗涤3次并过滤。气相色谱分析表明12%转化成苯乙酰甲醇。

(d)反应加有乙醇的液化石油气中反应

将苯甲醛(0.137g, 1.3 mmol)、酵母(5.4g)、乙醇(0.54ml)加上丙酮酸(0.216g, 2.45mmol)与水(5.4ml)的混合物(用醋酸铵缓冲至 $\text{pH} = 5.45$)置于
15 250ml不锈钢压力容器中。将LPG泵入容器,将容器加压至100 psi。然后将容器于室温搅拌24小时。24小时后,将反应容器缓慢脱气。用二乙醚将容器内容物和残余物洗涤3次并过滤。气相色谱分析表明14%转化成苯乙酰甲醇。

(e)用超临界二氧化碳萃取苯乙酰甲醇

20 于2009 psi压力和 40°C 温度下,用二氧化碳对在二氧化碳中反应形成的典型反应混合物萃取10分钟。经气相色谱分析表明苯乙酰甲醇已成功地从最初反应混合物中分离出来。

对本领域技术人员清楚的是,在此所做作的详细描述旨在阐明和领会
25 本发明,那些针对在此所述的实施方案和方法所作的改进和变化,并不偏离本说明书所公开的发明范畴。

以下列出了在此所引用的参考,全部引入作为参考。

参 考

- Chenevert, R. Fortier, G.和 Rhlid, R. B. *Tetrahedron*, 1992, 48, 6769-6776 ;
- Csuk, R.和 Glanzer, B. I. *Chem. Rev.*, 1991, 91, 49-57 ;
- 5 Groger, D., Schmander, H. P.和 Mothes, K. Z. *Allg. Mikrobiol.*, 1966, 6, 275 ;
- Hudlicky, T., Gillman, G.和 Andersen, C. *Tetrahedron Asymmetry*, 1992, 3, 281 ;
- Jayasinghe, L. Y., Smallridge, A. J.和 Trehwella, M. A. *Tetrahedron Letters*, 1993, 34, 3949 ;
- Jayasinghe, L. Y., Kodituwakku, D., Smallridge, A. J.和 Trehwella, M. A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1994, 67, 2528 ;
- 10 Kawai, A., Asano, T.和 Imai, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1988, 61, 3014 ;
- Long, A., James, P.和 Ward, O. P. *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 33, 657-660 ;
- Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S.和 Ohno, A. *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 2589-2593 ;
- 15 Nakamura, K., Miyai, T., Inoue, K., Kawasaki, S., Oka, S.和 Ohno, A. *Biocatalysts*, 1990, 3, 17-24 ;
- Nakamura, K., Kondo, S., Kawai, Y.和 Ohno, A. *Tetrahedron Letters*, 1991, 32, 7075 ;
- Nakamura, K., Kondo, S., Kawai, Y.和 Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1993, 66, 2738 ;
- Neuberg, C.和 Hirsch, J. *Biochem. Z.*, 1921, 115, 282-310 ;
- 20 North, M. *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 1699-1702 ;
- Sakaki, J., Kobayashi, S., Sato, M.和 Kaneko, C. *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37, 2952-2961 ;
- Servi, S. *Synthesis*, 1990, 1-25 ;
- Shiu, H. S.和 Rogers, P. L. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49, 52-62 .