



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **277 700 A1**

4(51) C 12 P 41/00
C 12 P 7/6?

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WPC 12 P / 322 710 7 (22) 06.12.88 (44) 11.04.90

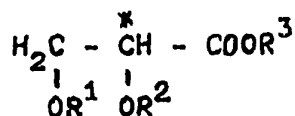
(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Szymanowski, Matthias, Dipl.-Chem.; Schrötter, Eberhard, Dr. rer. nat.; Schick, Hans, Prof. Dr. sc. nat.;
Knoll, Alexander, Dr. rer. nat.; Böhme, Monika, Dr. rer. nat.; Häfner, Barbara, Dr. rer. nat.; Drooscher, Peter,
Dr. rer. nat.; Schönecker, Bruno, Dr. sc. nat., DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von enantiomeren Glycerinsäurederivaten**

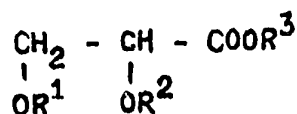
(55) enantiomeres Glycerinsäurederivat, enzymkatalysierte Hydrolyse, 2,3-Di-O-acylglycerinsäureester, Lipase
(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von enantiomeren Glycerinsäurederivaten durch enzymkatalysierte
Hydrolyse von 2,3-Di-O-acylglycerinsäureestern in einem wäßrigen System bei Temperaturen zwischen 0 und 80°C in
einem pH-Wert-Bereich zwischen 5 und 9 durch eine Lipase beschrieben.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von enantiomeren Glycerinsäurederivaten der allgemeinen Formel I,



in der R¹ und R² Wasserstoff oder Acyl bedeuten, wobei Acyl aliphatische Acyle mit vorzugsweise 2 bis 8 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls halogensubstituiert sein können, oder Arylalkanoyl, insbesondere Phenacetyl, darstellt und R³ niedere Alkyle mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeutet, **dadurch gekennzeichnet**, daß racemische 2,3-Di-O-acylglycerinsäurealkylester der allgemeinen Formel II,

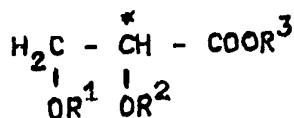


in der R¹, R², R³ die gleichen Bedeutungen wie in Formel I – jedoch kein Wasserstoff – haben, in einem wäßrigen System, gegebenenfalls unter Zusatz eines organischen Lösungsmittels, in Gegenwart einer Lipase bei Temperaturen zwischen 0 und 80 °C bei einem durch Basenzugabe konstanten pH-Wert zwischen 5 und 9 bis zu einem berechneten Umsatz hydrolysiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Liptasen solche tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs bzw. lipasehaltige Präparate, insbesondere Pankreatin, verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH-Wert während der Reaktion durch Basenzugabe vorzugsweise zwischen 6,8 und 8,5 gehalten wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hydrolyse in Abhängigkeit vom gewünschten Enantiomeren bei einem Umsatz von etwa 40 bzw. 60% abgebrochen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hydrolyse bei einer Temperatur zwischen 20 und 45 °C ausgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Basen Alkalihydroxide, vorzugsweise Natrium- oder Kaliumhydroxid, Erdalkalihydroxide, Ammoniak oder Amine sowie Salze schwacher Säuren, vorzugsweise Carbonate und Carbonsäuresalze, verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von enantiomeren Glycerinsäurederivaten der allgemeinen Formel I,



in der R¹ und R² Wasserstoff oder Acyl bedeuten, wobei Acyl aliphatische Acyle mit vorzugsweise 2 bis 8 C-Atomen, gegebenenfalls halogensubstituiert, oder Arylalkanoyl, insbesondere Phenacetyl, darstellt und R³ niedere Alkyle mit 1 bis 4 C-Atomen bedeutet, die Zwischenprodukte für Naturstoffsynthesen unter Verwendung von C₃-Bausteinen und Arzneimitteln, insbesondere von β-Rezeptorblockern und Platelet Activating Factor, sind.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bereits bekannt, Verbindungen der allgemeinen Formel I, in der R¹, R² und R³ die genannten Bedeutungen haben, aus Ausgangsverbindungen mit bekannter Chiralität (chiral pool), insbesondere D- oder L-Mannit (E. Baer, J. M. Grosheintz, H. O. L. Fischer, J. Am. Chem. Soc. **61**, 2607 [1939], H. O. L. Fischer, E. Baer, Helv. Chim. Acta **17**, 622 [1934], J. Biol. Chem. **128**, 463 [1939], *ibid.* **128**, 287 [1939], C. E. Ballou, J. W. Gillet, Biochem. **2**, 547 [1963]), D- oder L-Serin (C. M. Lok, J. P. Ward, D. A. van Dorp, Chem. Phys. Lipids **16**, 115 [1976], G. Hirth, W. Walter, Helv. Chim. Acta **68**, 1863 [1985], Fischer, Jacobs, Ber. **40**, 1070 [1957]) oder L-(S)-Erythrose (H. De Wilde, P. De Clercq, M. Vandewalle, Tetrahedron Lett. **28**, 4757 [1987]), herzustellen. Diese Ausgangsverbindungen sind entweder selbst sehr teuer oder erfordern zur Überführung in die Verbindungen der allgemeinen Formel I mehrstufige und damit ökonomisch aufwendige Verfahren.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, ein Verfahren zu erarbeiten, nach dem die Herstellung von enantiomeren Glycerinsäurederivaten in ökonomisch günstiger Weise möglich wird und die Nachteile der bekannten Verfahren verringert werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, die Herstellung von enantiomeren Glycerinsäurederivaten der allgemeinen Formel I durch kurze Verfahrenswege und die Verwendung von preiswerten Ausgangsverbindungen zu verbessern.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, indem erfindungsgemäß preiswerte racemische 2,3-Di-O-acyl-glycerinsäurealkylester der allgemeinen Formel II,



in der R¹ und R² Acyl bedeuten, wobei Acyl aliphatische Acyle mit vorzugsweise 2 bis 8 C-Atomen, gegebenenfalls halogensubstituiert, oder Arylalkanoyl, insbesondere Phenacetyl, darstellt und R³ niedere Alkyle mit 1 bis 4 C-Atomen bedeutet, der enzymatischen Hydrolyse unter Erhalt von Verbindungen der allgemeinen Formel I unterworfen werden.

Als Enzyme zur erfindungsgemäßen Hydrolyse von Verbindungen der allgemeinen Formel II sind Lipasen tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs bzw. lipasehaltige Präparate, wie Pankreatin, verwendbar.

Die enzymatische Hydrolyse wird im Temperaturbereich zwischen 0 und 80°C, vorzugsweise zwischen 20 und 45°C, ausgeführt. Der pH-Wert-Bereich wird zweckmäßig durch Ausführung der Hydrolyse in Pufferlösung und Nachstellen durch Basenzugabe im Bereich zwischen 5 und 9, vorzugsweise zwischen 6,8 und 8,5, gehalten. Als Basen werden insbesondere Alkalihydroxide, vorzugsweise Natrium- oder Kaliumhydroxid, Erdalkalihydroxide, Ammoniak oder Amine sowie Salze schwacher Säuren, vorzugsweise Carbonate und Carbonsäuresalze, verwendet. Die Hydrolyse wird entweder in rein wässrigem Medium oder unter Zusatz organischer Lösungsmittel ausgeführt. Als organische Lösungsmittel kommen solche, die die Löslichkeit nicht mit Wasser mischbarer Substrate der allgemeinen Formel II in der wässrigen Reaktionslösung verbessern, wie kurzkettige Alkohole, Ketone, Amine, THF, DMSO, Dioxan u. ä., in Frage. Ein solcher Lösungsmittelzusatz hat darüber hinaus verschiedentlich überraschende Steigerungen des Enantiomerenüberschusses bei der Hydrolyse zur Folge.

Das Verfahren kann nicht nur in homogener Phase, sondern auch im Zweiphasensystem ausgeführt werden. Geeignete Lösungsmittel für diese Arbeitsweise sind beispielsweise niedere Ester, Ether, Halogenkohlenwasserstoffe, einfache Aromaten oder längerkettige, insbesondere verzweigte Alkohole.

Das Verfahren kann in zwei Modifikationen durchgeführt werden. Einmal ist die enzymatische Spaltung von Verbindungen der Formel II möglich, so daß Verbindungen der Formel I, in der R¹ und/oder R² Wasserstoff bedeuten, erhalten und isoliert werden. Zur Erzielung einer hohen optischen Reinheit dieser Verbindungen ist es häufig zweckmäßig, den Umsatz nur bis zu etwa 40% ablaufen zu lassen.

Zum anderen können nach enzymatischer Hydrolyse des nichtgewünschten Enantiomers, die zweckmäßig bis zu einem Umsatz von etwa 60% geführt wird, Verbindungen der Formel I, in der R¹ und R² Acyl bedeuten, in hoher optischer Reinheit gewonnen werden.

Die Abtrennung der Reaktionsprodukte gemäß Formel I, in der R¹, R² und R³ die oben genannten Bedeutungen haben, aus dem Reaktionsgemisch und deren Reinigung erfolgen in an sich bekannter Weise durch Extraktion, Destillation oder chromatographische Verfahren.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

781 mg (3 mmol) 2,3-Di-O-butyroylglycerinsäuremethylester werden in 40 ml 0,067 M Phosphatpuffer (nach Sörensen; pH 7) suspendiert und auf 30°C erwärmt. Nach Zugabe von 20 mg Schweinepankreaslipase (SERVA; 20 U/mg) wird der pH-Wert durch Zutitrieren von 0,1 M NaOH bei 7,02 konstant gehalten. Nach 18 Minuten ist die berechnete Menge Lauge (16,5 ml = 55% Umsatz) verbraucht, die Reaktion wird abgebrochen und das Reaktionsgemisch 4mal mit insgesamt 160 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2mal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren des Trockenmittels im Vakuum eingeengt. Das Produktgemisch aus 2,3-Di-O-butyroylglycerinsäuremethylester und 2- sowie 3-O-Butyroylglycerinsäuremethylester wird durch flash-Chromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigsäureethylester getrennt.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses werden zum einen die Hydrolyseprodukte und zum anderen der nicht hydrolysierte 2,3-Di-O-butyroylglycerinsäuremethylester jeweils durch Umesterung mit Natriummethylat in absolutem Methanol und Neutralisieren des Reaktionsgemisches mit Kationenaustauscher KPS deacyliert und die so gewonnenen Glycerinsäuremethylester durch Destillation oder flash-Chromatographie an Kieselgel mit Hexan/Aceton gereinigt. 111 mg Glycerinsäuremethylester aus nichthydrolysiertes Ausgangsverbindung $[\alpha]_D^{20} = +4,8^\circ$ (c = 1,15; CHCl₃) = 96% ee (R-Enantiomer),

162 mg Glycerinsäuremethylester aus den Hydrolyseprodukten, $[\alpha]_D^{20} = -2,9^\circ$ (c = 2,65; CHCl₃) = 58% ee (S-Enantiomer)
K_{p0,1} = 74°C

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

3,13 ppm (3H, s, CH₃); 3,52 ppm (2H, d, J 5 Hz, CH₂); 4,05 ppm (1H, t, J 5 Hz, CH).

Beispiel 2

865 mg (3 mmol) 2,3-Di-O-pentanoylglycerinsäuremethylester werden analog Beispiel 1 umgesetzt. Dauer bis zum Erreichen des 53%igen Umsatzes (Verbrauch von 16 ml 0,1 M NaOH): 47 min Aufarbeitung wie in Beispiel 1 beschrieben.

122 mg Glycerinsäuremethylester aus nichthydrolysiertes Ausgangsverbinding, $[\alpha]_D^{20} = +4,26^\circ$ ($c = 1,75$; CHCl_3) = 85% ee (R-Enantiomer);

136 mg Glycerinsäuremethylester aus den Hydrolyseprodukten, $[\alpha]_D^{20} = -1,9^\circ$ ($c = 3,15$; CHCl_3) = 38% ee (S-Enantiomer).

Beispiel 3

745 mg (2 mmol) 2,3-Di-O-octanoylglycerinsäuremethylester werden analog Beispiel 1 umgesetzt. Dauer bis zum Erreichen des 50%igen Umsatzes (Verbrauch von 10 ml 0,1 M NaOH): 22 min 90 mg Glycerinsäuremethylester aus nichthydrolysiertes Ausgangsverbinding, $[\alpha]_D^{20} = -0,94$ ($c = 0,9$; CHCl_3) = 18,8% ee (S-Enantiomer);

98 mg Glycerinsäuremethylester aus den Hydrolyseprodukten, $[\alpha]_D^{20} = +0,93$ ($c = 4,9$; CHCl_3) = 18,6% ee (R-Enantiomer).

Beispiel 4

Analog Beispiel 1 unter Verwendung von Pankreatin (6 × NF) Dauer bis zum Erreichen des 55%igen Umsatzes (Verbrauch von 16,5 ml 0,1 M NaOH): 25 min.

Bestimmung der optischen Reinheit am 2,3-O-Isopropylidenglycerinsäuremethylester:

Herstellung des Glycerinsäuremethylesters wie in Beispiel 1 beschrieben, dann Umsetzung mit überschüssigem 2,2-Dimethoxypropan in CHCl_3 unter Zusatz katalytischer Mengen p-Toluolsulfonsäure; nach beendeter Umsetzung extraktive Aufarbeitung; Reinigung des Produktes durch Destillation oder flash-Chromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigsäureethylester.

142 mg 2,3-O-Isopropylidenglycerinsäuremethylester aus nichthydrolysiertes Ausgangsverbinding, $[\alpha]_D^{20} = +4,88^\circ$ ($c = 4,5$; CHCl_3) = 28% ee (R-Enantiomer);

211 mg 2,3-O-Isopropylidenglycerinsäuremethylester aus den Hydrolyseprodukten, $[\alpha]_D^{20} = -4,99^\circ$ ($c = 6,3$; CHCl_3) = 29% ee (S-Enantiomer);

$K_{p,12} = 80$ bis 85°C

$^1\text{H-NMR-Spektrum (CDCl}_3\text{)}$:

1,32 ppm (3H, s, CH_3), 1,4 ppm (3H, s, CH_3), 3,69 ppm (3H, s, OCH_3), 4,09 ppm (2H, m, CH_2), 4,51 ppm (1H, t, J 6 Hz, CH).

Beispiel 5

Analog Beispiel 1 unter Verwendung von 6 ml Lipaselösung SBL mikrobiellen Ursprungs (60 U/ml). Dauer bis zum Erreichen des 57%igen Umsatzes (Verbrauch von 17,1 ml 0,1 M NaOH): 6 h.

180 mg 2,3-O-Isopropylidenglycerinsäuremethylester aus nichthydrolysiertes Ausgangsverbinding, $[\alpha]_D^{20} = +12,36^\circ$ ($c = 4,65$; CHCl_3) = 71% ee (R-Enantiomer);

140 mg 2,3-O-Isopropylidenglycerinsäuremethylester aus den Hydrolyseprodukten, $[\alpha]_D^{20} = -5,78^\circ$ ($c = 3,85$; CHCl_3) = 33% ee (S-Enantiomer).