

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163917 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5592/83	(51) Int.Cl.5	C 07 C 69/675
(22) Indleveringsdag: 05 dec 1983		C 07 C 229/22
(41) Alm. tilgængelig: 07 jun 1984		C 07 C 235/16
(44) Fremlagt: 21 apr 1992		C 12 P 7/62
(86) International ansøgning nr.: -		C 12 P 13/02
(30) Prioritet: 06 dec 1982 US 447171 24 okt 1983 US 544957		C 12 P 13/04
(71) Ansøger: *SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.; 47, Viale Shakespeare; 00144 Rom, IT		
(72) Opfinder: Charles J. *Sih; US		

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Gamma-substituerede beta-hydroxybutansyrederivater og fremgangsmåde til fremstilling heraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5592-83

Fremgangsmåde til fremstilling af L-carnitin, ved hvilken γ -substituerede acetoeddikesyreester eller -amider udsættes for påvirkning af en mikroorganisme, der danner L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35], og det dannede, hertil svarende optisk aktive γ -substituerede β -hydroxybutansyrederivat udvindes og omdannes til L-carnitin.

En forbedring af fremgangsmåden omfatter omsætning af 4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat med natriumiodid eller -bromid til fremstilling af det tilsvarende 4-iod- eller 4-brom-3(R)-hydroxybutyrat, som omdannes til trimethylamino-3(R)-hydroxybutyratsalt som igen omdannes til et indre L-carnitinsalt. Desuden er hidtil ukendte mellemprodukter fremstillet ved fremgangsmåden.

DK 163917 B

Opfindelsen angår γ -substituerede β -hydroxybutansyre derivater, som er et mellemprodukt i fremstillingen af L-carnitin og en fremgangsmåde til mikrobiologisk reduktion af γ -substituerede aceteddikesyreestre eller 5 -amider til de respektive L- β -hydroxy- γ -substituerede butansyrederivater, som nemt kan omdannes til L-carnitinchlorid.

Som det er velkendt indeholder carnitin (β -hydroxy- γ -trimethylaminobutansyre) et asymetrisk centrum, og 10 derfor eksisterer carnitin på to stereoisomere former, D- og L-formen.

L-Carnitin er normalt til stede i den menneskelige organisme, hvor dets funktion er at transportere aktiverede, frie fedtsyrer med lange kæder over mitochondriemembranen. Idet mitochondriemembranen er impermeabel overfor acyl-CoA-derivater, kan frie fedtsyrer 15 med lange kæder kun trænge ind, hvis en forestering med L-carnitin har fundet sted. Bærerfunktionen af L-carnitin anvendes både til at transportere aktiverede 20 fedtsyrer med lange kæder fra de steder, hvor de biosyntetiseres, f.eks. mikrosomerne, ind i mitochondrierne, hvor de oxideres, og til at transportere acetyl-CoA fra mitochondrierne, hvor det dannes, til de ekstra-mitochondrielle lokaliteter, hvor syntesen af fedtsyrer 25 med lange kæder foregår, f.eks. til mikrosomerne, i hvilke acetyl-CoA kan udnyttes ved syntetisering af kolesterol og fedtsyrer.

Mens det er fastslået at den biologiske form udelukkende er den venstredrejede isomer (L-carnitin) 30 (D-carnitin indtil nu ikke har kunnet påvises i væv fra pattedyr), er D,L-carnitinracemat i en årrække blevet anvendt til forskellige indikationer. D,L-Carnitin er f.eks. solgt i Europa som appetitstimulans, og det er rapporteret, at stoffet har indflydelse på børns 35 vækst, se. f.eks. Borniche et al., Clinica Chemia Acta, 5, 171-176, 1960 og Alexander et al., "Protides in the Biological Fluids", 6th Colloquim, Bruges, 1958, 306-

310. U.S. patentskrift nr. 3.830.931 beskriver, at forbedringer i myocardial sammentrækkelighed og i systolisk rytme ved kongestiv hjerteinsufficiens ofte kan opnås ved indgivelse af D,L-carnitin. U.S. patentskrift nr. 3.968.241 beskriver anvendelsen af D,L-carnitin ved kardial arytmi. U.S. patentskrift nr. 3.810.994 beskriver anvendelsen af D,L-carnitin i behandlingen af fedme.

I den senere tid er der imidlertid lagt stigende vægt på vigtigheden af kun at anvende den venstredrejende carnitinisomer, i det mindste ved nogle terapeutiske anvendelser. Det er endog vist, at D-carnitin virker som kompetitiv inhibitor af carnitinbundne enzymer såsom carnitin-acetyl-transferase (CAT) og carnitin-palmityl-transferase. Endvidere har det for nylig vist sig, at D-carnitin kan sænke L-carnitinnmængden i hjertevævet. Følgelig er det nødvendigt udelukkende at indgive L-carnitin hos patienter, der er under medicinsk behandling for hjerteinsufficiens eller for forhøjet indhold af lipider i blodet.

Der er foreslået adskillige fremgangsmåder til fremstilling af carnitin i industriel skala. Kemisk syntese af carnitin fører imidlertid uundgåeligt til en racemisk blanding af D- og L-isomerer. Følgelig må der anvendes adskillelsesmetoder til opnåelse af separate enantiomere forbindelser fra den racemiske blanding. Disse adskillelsesmetoder er imidlertid besværlige og dyre.

Det tilsigtes med opfindelsen at tilvejebringe hidtil ukendte, nyttige optisk aktive mellemprodukter i fremstillingen af L-carnitin og dets salte eller estere.

Det tilsigtes desuden med opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af de hidtil ukendte optisk aktive mellemprodukter.

Det tilsigtede samt flere fordele af opfindelsen vil fremgå tydeligere længere fremme i beskrivelsen.

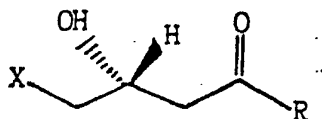
Opfindelsens fordele vil for en fagmand tydeligt fremgå af den følgende detaljerede beskrivelse.

Det er kendt at β -ketogruppen i 3-stillingen i γ -substituerede aceteddikesyrederivater kan reduceres
 5 ved hydrogenering over Pt/C (se f.eks. U.S. patent-skrift nr. 3.969.406). Hydroxyforbindelsen, der opnås ved en sådan fremgangsmåde, findes imidlertid i en racemisk blanding. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan hydrogeneringen af oxo-gruppen i 3-stillingen
 10 derimod udføres stereoselektivt, ved at anvende fermentativ indvirkning af en mikroorganisme, til opnåelse af optisk aktive γ -substituerede β -hydroxybutansyrederivater.

Specielt opnås 3(R)- eller L-epimeren, i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, ved
 15 passende valg (som beskrevet nedenfor) af det substrat, der skal fermenteres. Denne epimer kræves til omdannelsen til naturligt forekommende L-carnitin.

I store træk omfatter opfindelsen anvendelsen
 20 af det mikrobielle reduktaseenzym, L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35], til at katalysere stereoselektiv hydrogenering af γ -substituerede aceteddikesyrederivater, som er defineret nedenfor.

Opfindelsen tilvejebringer således forbindelser
 25 med følgende formel, hvoraf bl.a. 3(R)-konfigurationen fremgår,



30 i hvilken X betegner Cl, Br, I eller OH og

R betegner en alkoxygruppe med mellem 1 og 15 carbonatomer,

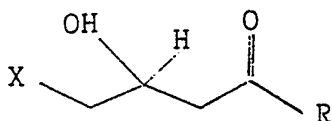
phenoxy- eller phenylalkoxygruppe med mellem 7 og 14 carbonatomer eller en phenyl-

35 aminogruppe.

Opfindelsen omfatter også en fremgangsmåde til fremstilling af optisk aktive γ -substituerede β -hydroxy-

4

butansyrederivater med formlen



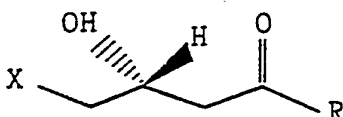
5 i hvilken X er Cl, Br, I eller OH og

R betegner en alkoxygruppe, der har mellem 1 og 15
carbonatomer,

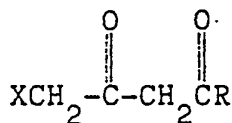
phenoxy- eller phenylalkoxygruppe med mellem
7 og 14 carbonatomer eller en phenylamino-
10 gruppe

ud fra de tilsvarende γ -substituerede aceteddikesyre-
esterer eller -amider, som udsættes for fermentativ en-
zymatisk indvirkning af mikroorganismer, der danner L- β -
hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35], og udvin-
15 ding af de ønskede optisk aktive γ -substituerede β -hy-
droxybutansyrederivater.

I særdeleshed omfatter fremgangsmåden, til frem-
stilling af optisk aktive γ -substitueret 3(R)-hydroxy-
butansyrederivater med følgende formel, af hvilken bl.a.
20 3(R)-konfigurationen fremgår,



25 at forbindelser med formlen

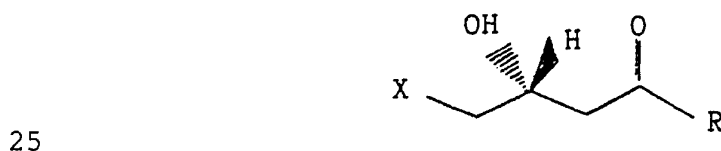


30 hvor X og R har de ovenfor fastlagte betydninger, hvor
R har mellem 5 og ca. 15 carbonatomer, hvis den be-
tegner en alkoxygruppe, udsættes for fermentativ enzy-
matisk indvirkning af mikroorganismer, der danner L- β -
hydroxyacyl CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35], og udvin-
35 ding af de ønskede optisk aktive 4-substituerede 3(R)-
hydroxybutansyrederivater fra reaktionsblandingen.

Det har vist sig, at en hvilken som helst mikro-
 organisme, der danner det ønskede enzym, er i stand til
 at katalysere den stereoselektive reduktion. Særligt
 egnede er mikroorganismer af klassen Ascomycetes, fami-
 5 lerne Endomycetales, Mucorales, Moniliales og Eurotia-
 les, samt slægten *Saccharomyces*. Særligt foretrukne er
Saccharomyces cerevisiae.

Til fremstilling af optisk aktive 4-substitue-
 rede 3(R)-hydroxybutansyreestere indeholdende 1-4 car-
 10 bonatomer, er det nødvendigt at anvende oprenset L-β-
 hydroxyacyl CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35] f.eks. fra
 svinehjerter, fordi intakte mikroorganismer indeholder
 interfererende oxido-reduktaser, der giver den modsatte
 konfiguration. Således giver mikrobiel reduktion af
 15 f.eks. 4-chloraceteddikesyreestere med 1-4 carbonatomer
 4-chlor-3-hydroxybutyrater med en utilfredsstillende
 optisk renhed.

Opfindelsen tilvejebringer derfor også en frem-
 gangsmåde til fremstilling af optisk aktive γ-substitue-
 20 rede 3(R)-hydroxybutansyrederivater med følgende formel,
 hvoraf bl.a. 3(R)-konfigurationen fremgår



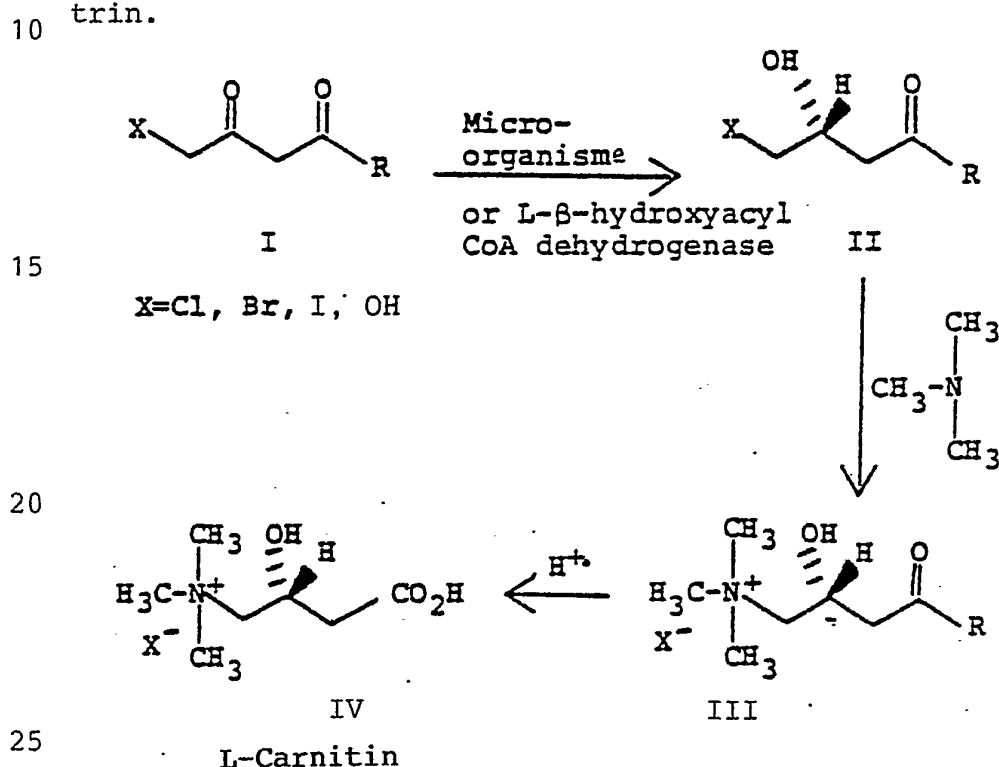
i hvilken X betegner Cl, Br, I eller OH, og R betegner
 en alkoxygruppe med 1-4 carbonatomer, hvilken omfatter
 at en forbindelse med formlen



i hvilken X og R har de ovenfor bestemte betydninger
 35 udsættes for enzymatisk indvirkning af L-β-hydroxyacyl-
 CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35] på oprenset form, samt

udvinding af de ønskede optisk aktive γ -substituerede 3(R)-hydroxybutansyrederivater fra enzymreaktionsblandingen.

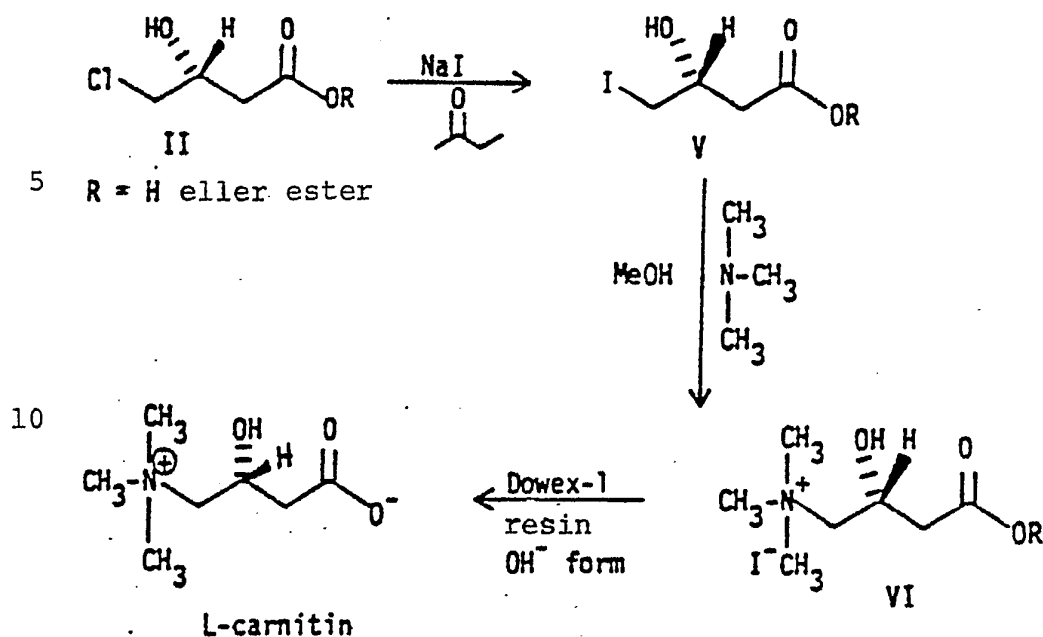
De optisk aktive γ -substituerede L- β -hydroxybutansyrederivater kan omsættes med trimethylamin til opnåelse af de korresponderende γ -trimethylammonium-L- β -hydroxybutansyrederivater, som let kan omdannes til L-carnitin ved behandling med vandig syre. Nedenstående reaktionsskema viser reaktionens enkelte



Det har vist sig, at reaktionen I $\rightarrow$ II forløber lettest, hvis X = Cl. Da den efterfølgende reaktion II $\rightarrow$ III imidlertid giver bedst udbytte, når X = iod eller brom, foretrækkes det først at fremstille Cl-derivatet og derefter omdanne det til det korresponderende I- eller Br-derivat.

En forbedret fremgangsmåde er først at omdanne 4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreester til det korresponderende 4-iod- eller 4-brom-3(R)-hydroxybutyrat. For nemheds skyld refereres nedenfor til iodderivatet. Iodforbindelsen (V) kan omsættes glat med trimethylamin ved stuetemperatur til opnåelse af VI, der let kan omdannes til L-carnitin

i overensstemmelse med det følgende reaktionsskema:



De før omtalte reaktioner, som eksemplificeret ved reaktionsligningerne, kan udsættes for talrige variationer. Uanset hvilken form, der således fremstilles, omsættes esteren med natriumiodid i et passende opløsningsmiddel, såsom 2-butanon, acetone butanol, osv.

Den ønskede hovedreaktion med natriumiodid på dette sted i reaktionen er en substitutionsreaktion, som danner iodforbindelsen (V), uden at forstyrre det 25 chirale centrum ved carbonatomet i nabostilling. Til denne reaktion kræves mindst tilstrækkeligt natriumiodid til at erstatte alt chlor i II. Generelt sagt anvendes et lille overskud af natriumiodid.

Omsætningen af V med trimethylamin kan gennem- 30 føres ved en moderat temperatur f.eks. ved 25°C (se S. G. Boots og M.R. Boots, J. Pharm, Sci., 64, 1262, 1975) i en række forskellige opløsningsmidler såsom methanol eller ethanol, der indeholder trimethylamin i overskud. Det er værd at lægge mærke til, at der afhængigt af 35 hvilken alkohol der anvendes som opløsningsmiddel, sker en omesterificering. F.eks. dannes L-carnitinmethyl-ester ved reaktionen, når methanol anvendes som opløs-

ningsmiddel. Denne omesterificering er fordelagtig, idet at L-carnitinmethylester som bekendt kan omdannes direkte til L-carnitin på fri baseform ved passage gennem en ionbytterkolonne (OH^-) (se E. Strack og J. Lorenz, 5 J. Physiol. Chem (1966) 344, 276).

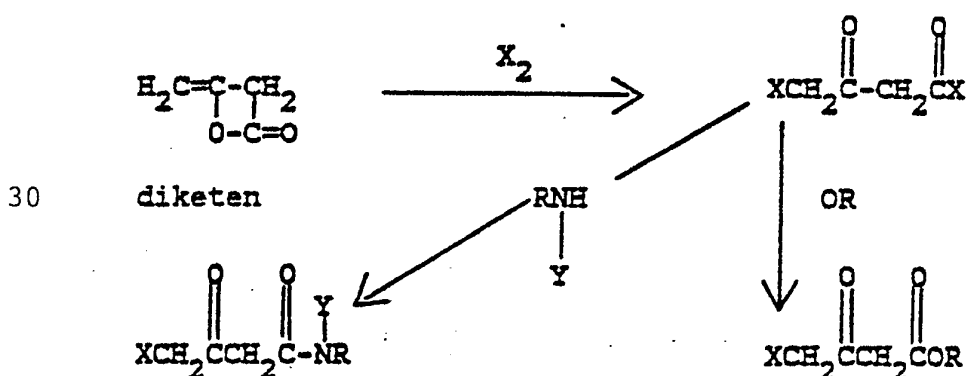
Det kan ses af beskrivelsen af de ovenstående processer, at der dannes flere forskellige hidtil ukendte og meget nyttige optisk aktive mellemprodukter. Specielt nyttig er 4-iod-3(R)-hydroxybutansyrealkyl-
10 estere, hvor alkylgruppen indeholder mellem 6 og 10 carbonatomer. Octylesteren er særligt foretrukket.

Mikroorganismer med den ønskede oxido-reduktaseaktivitet er velkendte indenfor mikrobiologien, og en vilkårlig af disse mikroorganismer kan anvendes ved
15 gennemførsel af processen ifølge opfindelsen (se K. Kieslich, "Microbial Transformations of Non-Stereoid Cyclic Compounds" (George Thime Publishers, Stuttgart, 1976)) med slægterne af mikroorganismer, der specielt er beskrevet heri som særligt egnede. Let tilgængelige
20 og billige mikroorganismer af slægten *Saccharomyces*, f.eks. ølgær, bagegær eller vingær (*Saccharomyces vini*) har vist sig at producere L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (EC 1.1.1.35] og at være særdeles fordelagtige ved gennemførsel af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.
25 Enzymet er beskrevet af S.J. Wakil og E.M. Barnes Jr. in Comprehensive Biochemistry Vo. 185(1971) side 57-104.

4-Substitueret aceteddikesyresubstrat kan inkorporeres i et næringsmedium med standardsammensætning, i hvilket disse mikroorganismer dyrkes ved sædvanlige
30 fermenteringsbetingelser, for at fremkalde den reduktive omsætning. Alternativt kan den aktive bestanddel fjernes fra den dyrkede kultur af mikroorganismer, f.eks. ved opløsning af cellerne for at frigøre enzymer, eller ved suspension af hvilende celler i et friskt vandigt
35 system. Ved en vilkårlig af disse metoder vil β -keto-gruppen blive reduceret selektivt, så længe det af mikroorganismerne dannede aktive system er til stede i mediet. Som det vil stå klart for en sagkyndig vil reak-

tionstiden selvfølgelig være afhængig under hvilke temperatur- og trykforhold kontakten af 4-substitueret aceteddikesyrederivat med aktivt enzym finder sted. F.eks. vil det tid, der er nødvendig til at forårsage den reductive omsætning, være mindre ved let opvarmning og atmosfæretryk end hvis reaktionen alt andet lige forløber ved stuetemperatur. Selvfølgelig må hverken tryk eller temperatur være så høj eller tiden så lang, at det resulterer i, at substratet nedbrydes. I de tilfælde, der anvendes en organismekultur i vækst, skal reaktionsbetingelserne være så milde, at organismerne ikke dræbes inden de har produceret tilstrækkeligt hydrolytisk enzym til at reaktionen er i stand til at forløbe. Generelt kan temperaturen variere fra ca. 10°C til ca. 35°C, og reaktionstiden fra ca. 12 timer til ca. 10 dage ved atmosfæretryk.

I de følgende eksempler, i hvilke opfindelsen belyses nærmere, var γ -halogenaceteddikesyrederivat-substraterne, der blev udsat for mikrobiel reduktion, fremstillet ud fra diketenen i overensstemmelse med den generelle metode af C.D. Hurd og H.L. Abernethly (J. Am. Chem. So., 62, 1147, 1940) for γ -chloraceteddikesyrederivater og F. Chick, N.T.M. Wilsmore (J. Chem. Soc., 1978 (1910)) for γ -bromaceteddikesyrederivaterne via det følgende reaktionsskema:



35

hvor X = Cl eller Br

Y = H eller alkyl

R = som beskrevet tidligere

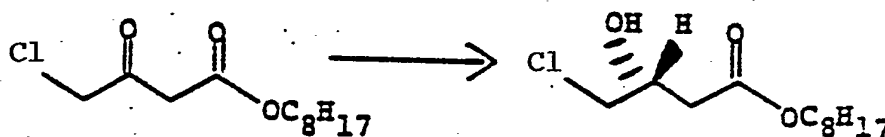
Alternativt kan γ -halogenaceteddikesyrederivaterne, hvis det ønskes, fremstilles ud fra γ -halogened-dikesyreestere ved almindelig Grignard reaktion. F.eks. blev γ -chloraceteddikesyreoctylester let fremstillet 5 ved at koge γ -chloroctylesteren med to ækvivalenter magnesium under tilbagesvaling i 48 timer. Efter fjernelse af opløsningsmidlet blev aceteddikesyreoctyl-esteren udvundet med 70% udbytte.

γ -Hydroxyaceteddikesyrederivater blev fremstil- 10 let ud fra deres korresponderende γ -bromaceteddikesyrederivater ved omrøring i dioxan-vandopløsning (1:1) indeholdende CaCO_3 ved 25°C i 12 timer.

Hvert af de i overensstemmelse med de følgende eksempler fremstillede stoffer, blev identificeret med 15 hensyn til struktur ved brug af kernemagnetisk resonan-ce (nmr) og indfrarød spektroskopi samt ved tyndtlags-chromatografi (TLC). Den optiske renhed og den abso-lutte konfiguration af produkterne blev fastlagt såvel ved deres omdannelse til L-carnitin som ved deres omdan- 20 nelse til estere. Disse analyseres let ved hjælp af nmr-spektroskopi og optisk drejning.

Eksempel 1 (gær)

(+)-4-Chlor-3(R)-hydroxybutansyreoctylester blev 25 fremstillet som følger:



30

A. Fermentering. Overfladevækst af en ugegammel agerkultur af *Candida keyfr.* NRRL Y-329, dyrket på en agar med følgende sammensætning:

35

11

	Agar	20 g
	Glucose	10 g
	Gærekstrakt	2,5 g
	K_2HPO_4	1 g
5	Destilleret vand, q.s.	1 liter

(Steriliseret 15 min. ved 20 p.s.i.)

blev suspenderet i 5 ml 0,85% saltopløsning. En portion på 1 ml af denne suspension blev brugt til at inoculere en 250 ml Erlenmeyer-kolbe (F-1 trin) indeholdende 50 ml

10 af det følgende medium (Vogel's medium):

	Gærekstrakt	5 g
	Casaminosyrer	5 g
	Dextrøse	40 g
	Na_3 -citrat x 5,5 H_2O	3 g
15	KH_2PO_4	5 g
	NH_4NO_3	2 g
	$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,1 g
	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2 g
	Sporelementopløsning	0,1 ml
20	Destilleret vand, q.s.	1 liter
	pH	5,6

(steriliseret i 15 min. ved 30 p.s.i.)

	<u>Sporelementopløsning</u>	<u>g/100 ml</u>
25	Citronsyre x 1 H_2O	5
	$ZnSO_4$ x 7 H_2O	7
	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ x 6 H_2O	1
	$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,25
	$MgSO_4$ x 1 H_2O	0,05
30	H_3BO_3	0,05
	NaH_2MoO_4 x 2 H_2O	0,05

Kolben blev inkuberet på en rotationsryster (250 cykler pr. min-2" radius) i 24 timer ved 25°C, herefter
 35 overførtes 10 volumen% af flaskens indhold til en anden 250 ml Erlenmeyerkolbe (F-2 trin) indeholdende 50 ml af Vogel's medium. Efter 24 timers inkubation på en rotationsryster blev 150 mg γ -chloraceteddikesyreoctylester

i 0,1 ml 10% "Tween 80" tilsat. F-2 trin-flasken blev herefter inkuberet i endnu 24 timer under de samme betingelser som anvendt ved inkuberingen af F-1 trin-flasken.

- 5 B. Isolation. 24 Timer efter tilsætningen af γ -chloraceteddikesyreoctylester, blev cellerne fjernet ved centrifugering. Væskefasen blev ekstraheret med 50 ml ethylacetat tre gange. Ethylacetatopløsningen blev tørret over Na_2SO_4 og inddampet til opnåelse af 10 olieagtig remanens (186 g). Remanensen blev opløst i 0,5 ml af den mobile fase og ført gennem en kolonne (1 x 25 cm) med silicagel (MN-kieselgel 60). Kolonnen blev elueret med "Skelly B":ethylacetat (8:1) og fraktioner af 14 ml blev opsamlet. Fraktion 6 og 7 indeholdt 15 det ønskede produkt og blev forenet og inddampet til tørhed, hvorved der fremkom 120 mg af en krystallinsk remanens. Omkrystallisation i ethylacetat-hexan gav 107 mg 4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreoctylester $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +13,3^\circ$ (c, 4,45) (CHCl_3); pmr (δCDCl_3) 0,88 [3H, tr. 20 forvredet, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$]; 1,28 [10H, s, $-(\text{CH}_2)_5-$]; 1,65 (2H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-$); 2,62 (2H, d, J = 6 Hz, O $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOR}$); 3,22 (1H, br., $-\text{OH}$); 3,60 (2H, d, J = 6 25 Hz, $\text{ClCH}_2-\text{CH}-\text{R}$); 4,20 (3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2$ og $-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$). OH OH O

Analyseberegning for $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Cl}$: C, 57,47; H 9,25; Fundet: C 57,52; H 9,07. [TLC R_f - 0,5 Brinkmann silica-gelplade, 0,25 cm EM; Skelly B:ethylacetat (5:1).]

30

Eksempel 2

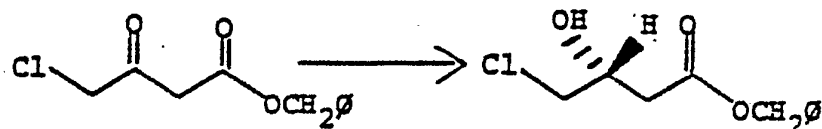
- Hvilende celler. 100 gram kommercielt tilgængelig, frisk bagegær *Saccharomyces cerevisiae* (Red Star) suspenderet i 250 ml postevand, til hvilket der var tilsat 10 g 35 saccharose og 3,6 g γ -chloraceteddikesyreoctylester. Efter at idholdet var inkuberet i 24 timer på en rotationsryster (250 cykler/min. - 2" radius) ved 25°C , blev yderligere 10 g saccharose sat til kolben, og man lod

reaktionen forløbet i endnu 24 timer. Cellerne blev derefter fjernet ved filtrering gennem celiteskive. Cellerne blev vasket med vand og med ethylacetat. Vaskevæskerne blev forenet med filtratet og fuldstændigt ekstraheret med ethylacetat. Ethylacetatfasen blev tørret over MgSO_4 og inddampet til en olieagtig remanens, som blev chromatograferet i en silicagelkolonne til opnåelse af 2,52 g 4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreoctylester, som et fast stof med lavt smeltepunkt. $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +13,2^\circ$ (c, 4,0, CHCl_3).

Eksempel 3

(+)-4-Chlor-3(R)-hydroxybutansyrebenzylester blev fremstillet som følger:

15



A. Fermentering. Overfladevækst af en ugegammel agar-kultur af *Gliocladium virens* ATCC 13362, dyrket på en agar med følgende sammensætning:

	Maltekstrakt	20 g
	Glucose	20 g
	Pepton	1 g
25	Agar	20 g
	Destilleret vand, q.s.	1 liter
	(steriliseret 15 min. ved 20 p.s.i.)	

blev suspenderet i 5 ml 0,85% saltopløsning. En portion på 1 ml af denne suspension blev brugt til at inoculere en 250 ml Erlenmeyer-kolbe (F-1 trin) indeholdende 50 ml af den følgende medium (Sojabønne-dextrosemedium):

	Sojamel	5 g
	Dextrose	20 g
	NaCl	5 g
35	KH_2PO_4	5 g
	Gær	5 g
	Vand	1 liter
	pH justeret til	7,0

Autoklaveret ved 15 p.s.i. i 15 minutter
 Kolben blev inkuberet på en rotationsryster
 (250 cykler/min - 2" radius) i 24 timer ved 25°C,
 hvorefter 10 volumen% af indholdet blev overført til en
 5 anden 250 ml Erlenmeyer-kolbe (F-2 trin) indeholdende
 50 ml sojabønne-dextrosemedium. Efter inkubation i
 24 timer på en rotationsryster, blev 150 mg γ -chloracet-
 eddikesyrebenzylester i 0,1 ml 10% "Tween 80" tilsat.
 F-2 trin-kolben blev herefter inkuberet i endnu 24 timer
 10 under de samme betingelser, der blev anvendt ved inku-
 bering af F-1 trin-kolben.

B. Isolation. 24 Timer efter tilsætningen af γ -chlor-
 aceteddikesyrebenzylester, blev myceliet fjernet ved
 filtrering. Filtratet blev ekstraheret med 50 ml ethyl-
 15 acetat tre gange. Ethylacetatfasen blev tørret over
 MgSO_4 og under vakuum inddampet til en rest på 160 mg.
 Denne rest blev chromatograferet i en silicagelkolonne
 (MN-kisegel 60; 1 x 25 cm). Kolonnen blev elueret
 med "Skelly B" og ethylacetat (10:1), og fraktioner
 20 af 12 ml blev opsamlet. Fraktionerne 11-16 indeholdt
 det ønskede produkt og blev forenet og inddampet til
 tørhed, hvorved der fremkom 115 mg 4-chlor-3(R)-hydroxy-
 butansyrebenzylester, $[\alpha]_D^{23} + 8,7^\circ$ (c, 5,26; CHCl_3);
 $\text{pmr} (\delta\text{CDCl}_3)$ 2,65 (2H, d, J = 6 Hz, $-\text{CH}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}-\text{COOR}$);
 25 3,20 (1H, br, $-\text{OH}$); 3,54 (2H, d, J = 6 Hz, $\text{Cl}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}$);
 4,20 (1H, m, $-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$); 5,12 (2H, s, $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$);
 30 7,31 (5H, s, fem aromatiske protoner). Analyseberegning
 for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Cl}$: C 57,77, H 5,73. Fundet: C 57,64,
 H 5,67. TLC silicagel EM Brinkmannplade, 0,25 cm, R_f =
 0,43, "Skelly B"-ethylacetat (5:1).

35 Eksemplerne 4-23

Den samme fremgangsmåde i i eksempel 1 blev gen-
 taget med hver af organismerne opstillet i tabel 1, med

den undtagelse, at γ -chloraceteddikesyreoctylesteren blev tilsat til en koncentration på 1 mg/ml. Omsætning til det ønskede produkt (+)4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreoctylester fandt sted. Fremgangsmåden i disse eksempler blev gentaget med kontinuert tilsætning af substratet til gærmediet. Vægtforholdet substrat/gær var ca. 1:1,5 med fremragende omsætning til det ønskede produkt.

10 Eksemplerne 24-48

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med enhver af organismerne opstillet i tabel 2, med den undtagelse, at γ -chloraceteddikesyreoctylester (1 mg/ml) blev anvendt. Omsætning til det ønskede forbindelse, (+)4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreoctylester fandt sted.

Eksemplerne 49-68

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med enhver af organismer opstillet i tabel 1 med den undtagelse, at γ -chloraceteddikesyrebenzylester (1 mg/ml) blev anvendt som substrat. Omsætning til det ønskede produkt (+)4-chlor-3(R)-hydroxybutansyrebenzylester fandt sted.

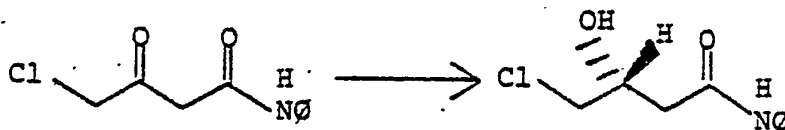
25

Eksemplerne 69-93

Den samme fremgangsmåde i eksempel 3 blev gentaget med enhver af organismerne opstillet i tabel 2 med brug af γ -chloraceteddikesyrebenzylester som substrat (1 mg/ml). Omdannelse til det ønskede produkt (+)4-chlor-3(R)-hydroxybutansyrebenzylester fandt sted.

Eksempel 94

(+)4-Chlor-3(R)-hydroxybutansyreanilid blev fremstillet i overensstemmelse med fremgangsmåden i eksempel 2, bortset fra at 4-chloracetoacetanilid blev brugt ved en koncentration på 1 mg/ml



- 5 som substrat for omsætningen til det ønskede optisk aktive produkt, smp. 110-111°C; $[\alpha]^{23} +17,5^\circ$ (c, 3,0 CHCl_3); pmr ($\delta\text{CD}_3\text{CCD}_3$) 2,67 (2H, d, J = 6 Hz, -HOCHCH₂-CONHR); 3,66 (2H, d, J = 6 Hz, ClCH₂CHOH-R); 4,43 (1H, m, -CH₂-CHOH-CH₂-); 7,03-7,44 (3H, m, aromatiske protoner i meta- og parastilling); 7,69 (2H, d, J = 6 Hz, aromatiske protoner i orthostilling); 9,24 (1H, br, -C(=O)-HN-Ø). Analyseberegning for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{Cl}$: C 56,21; H 5,66. Fundet: C 56,17; H 5,47.

15

Eksemplerne 95-114

- Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med enhver af organismerne opstillet i tabel 1 bortset fra at γ -chlor-acetoacetanilid blev tilsat til en koncentration på 1 mg/ml. I alle tilfælde fandt omsætning til det ønskede produkt (+)-4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreanilid sted.

Eksemplerne 115-139

- 25 Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med enhver af organismerne opstillet i tabel 2. γ -Chloracetoacetanilid blev tilsat til en koncentration på 1 mg/ml. I disse tilfælde blev omsætning til det ønskede (+)-4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreanilid opnået.

Eksemplerne 140-159

- 35 Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 1, bortset fra at γ -bromacetoeddikesyreoctylester (1 mg/ml) blev anvendt som substrat. Omsætning til det ønskede produkt (+)-4-brom-3(R)-hydroxybutansyreoctylester blev opnået.

Eksemplerne 160-184

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 2 med den undtagelse, at γ -bromaceteddikesyreoctylester (1 mg/ml) blev anvendt. Omsætning til det ønskede produkt (+)4-brom-3(R)-hydroxybutansyreoctylester fandt sted.

Eksemplerne 185-204

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 1 med den undtagelse, at γ -bromaceteddikesyrebenzylester (1 mg/ml) blev anvendt som substrat. Omsætning til det ønskede produkt (+)4-brom-3(R)-hydroxybutansyrebenzylester fandt sted.

Eksemplerne 205-229

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 2 med den forskel, at γ -bromaceteddikesyrebenzylester (1 mg/ml) blev anvendt. Omsætning til det ønskede produkt (+)4-brom-3(R)-hydroxybutansyrebenzylester blev opnået.

Eksemplerne 230-249

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 1 med den forskel, at γ -bromacetoacetanilid (1 mg/ml) blev brugt som substrat. Omsætning til det ønskede (+)4-brom-3(R)-hydroxybutansyreanilid blev opnået.

Eksemplerne 250-274

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 2 med den forskel, at γ -bromacetoacetanilid (1 mg/ml) blev brugt som substrat. Omsætning til det ønskede (+)4-brom-3(R)-hydroxybutansyreanilid blev opnået.

Eksemplerne 275-294

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 1 med den forskel, at γ -hydroxyaceteddikesyreoctylester (1 mg/ml) blev brugt som substrat. Omsætning til det ønskede 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutansyreoctylester fandt sted.

Eksemplerne 295-319

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 2 med den forskel, at γ -hydroxyaceteddikesyreoctylester (1 mg/ml) blev brugt som substrat. Omsætning til det ønskede 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutansyreoctylester fandt sted.

Eksemplerne 320-339

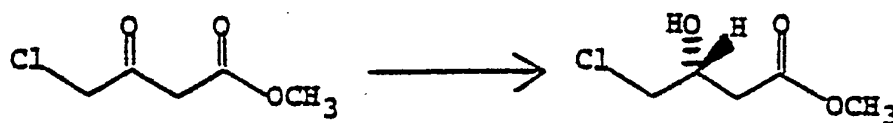
Den samme fremgangsmåde som i eksempel 1 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 1 med den forskel, at γ -hydroxyacetoacetanilid (1 mg/ml) blev brugt som substrat. Omsætning til det ønskede 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutansyreanilid blev opnået.

Eksemplerne 340-364

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 3 blev gentaget med organismerne opstillet i tabel 2 med den forskel, at γ -hydroxyacetoacetanilid (1 mg/ml) blev anvendt som substrat. Omsætning til det ønskede 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutansyreanilid blev opnået.

Eksempel 365

Methyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat (VIII)



35

VII

VIII

Methyl-4-chloracetoacetat (VII) (100 mg), 29 enheder svinehjerne (EC 1.1.1.35), β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (Sigma, H4626) og 1,36 g NADH (Sigma, 90%) blev inkuberet i 30 ml 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH 6,5.

Efter henstand i 30 timer ved 25°C blev reaktionsblandingen ekstraheret fire gange med 30 ml ethylacetat. Det organiske fase blev tørret over natriumsulfat og inddampet til tørhed under reduceret tryk. Remanensen blev chromatograferet gennem en silicagelkolonne (12 g silicagel, 1,3 x 34 cm). Kolonnen blev elueret med en opløsningsmiddelblanding bestående af "Skelly B"-ethylacetat (8:1), og fraktioner á 20 ml blev opsamlet. Fraktionerne 9-11, som indeholdt det ønskede methyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat (VIII) identificeret ved TLC analyse og med $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +23,5^{\circ}$ (c, 5,2 CHCl_3), blev forenet.

Eksempel 366

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 365 blev gentaget med brug af ethyl-4-chloracetoacetat som substrat til dannelsen af ethyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat, $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +22,7^{\circ}$ (c, 4,7, CHCl_3).

Eksempel 367

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 365 blev gentaget med brug af n-propyl-4-chloracetoacetat som substrat til dannelsen af n-propyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat, $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +21,5^{\circ}$ (c, 5,0, CHCl_3).

Eksempel 368

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 365 blev gentaget med brug af n-butyl-4-chloracetoacetat som substrat til dannelsen af n-butyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat, $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +20,1^{\circ}$ (c, 3,1, CHCl_3).

Generel fremgangsmåde til omdannelse af 4-halogen-3(R)-hydroxybutansyreestere og -amider til L-carnitin.

Eksempel 369

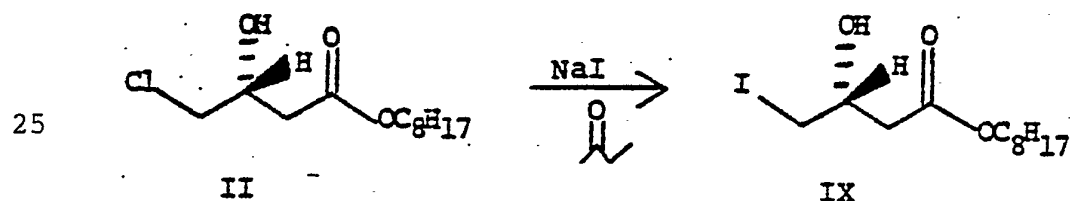
En blanding af 4-chlor-3(R)-hydroxybutansyreoc-
 tylester (1,5 g), ethanol (3 ml) og trimethylamin
 (25 vægt% opløsning) i vand (3 ml) blev opvarmet til
 5 80-90°C i ca. 2 timer. Blandingen indampes til tørhed
 under vakuum til opnåelse af 1,8 g råprodukt. Det rå
 produkt (1 g) blev opvarmet til 80-90°C i en 10% HCl-
 opløsning (7 ml) i 1,5 timer. Efter afdrivning af op-
 løsningsmidlet under reduceret tryk, blev råproduktet
 10 ekstraheret to gange med absolut ethanol (10 ml), og
 ethanolen blev afdrejet under vakuum. Den krystallinske
 remanens blev opløst i en lille mængde ethanol og L-car-
 nitinchlorid, smp. 142°C (dek.); $[\alpha] -23,7^\circ$ (c, 4,5,
 H₂O), blev udfældet i godt udbytte (320 mg) ved til-
 15 sætning af ether.

L-Carnitinchlorid kan let omdannes til det farma-
 ceutisk foretrukne indre L-carnitinsalt ved velkendte
 ionbytningsmetoder.

20

Eksempel 370

Octyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat (IX)

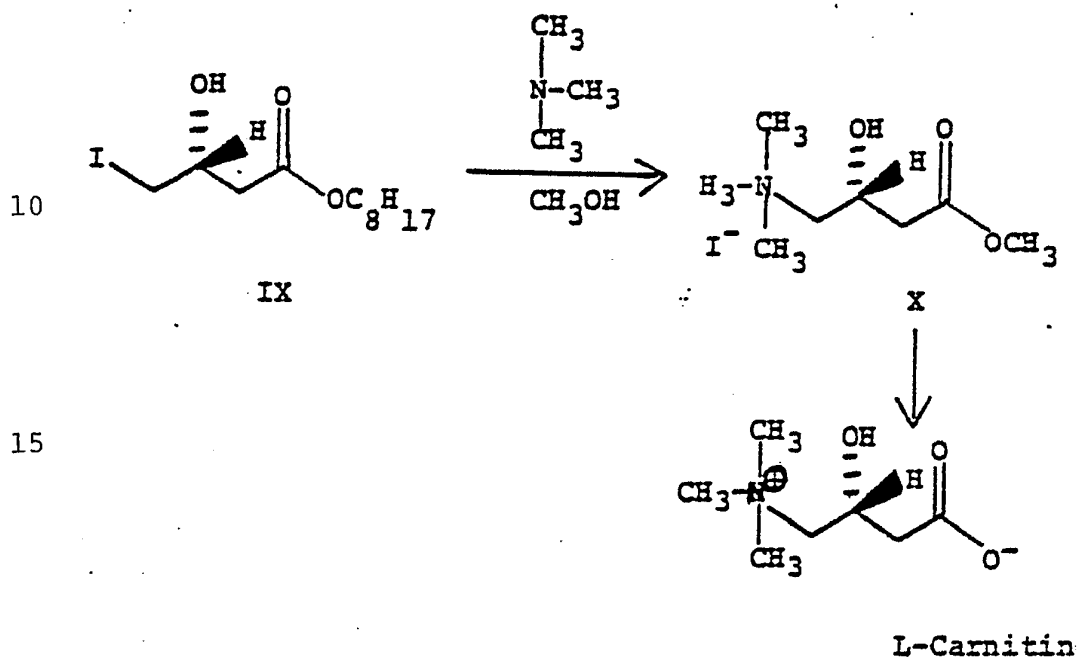


En blanding af octyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat
 (II) (1,426 g) og vandfrit NaI (1,2 g) i 15 ml methyl-
 30 ethylketon blev kogt under tilbagesvaling i 24 timer.
 Blandingen blev rotationsinddampet og omsat med ether
 (100 ml) og vand (50 ml). Den organiske fase blev skilt
 fra og vasket med en 10% natriumsulfatopløsning (150 ml)
 samt med en saltvandsopløsning (150 ml) og tørt over
 35 vandfrit natriumsulfat. Opløsningsmidlet blev afdrejet
 under reduceret tryk, hvorved der fremkom 1,762 g af IX
 som en lys, gul olie. IR (tynd film) 3460 cm⁻¹ (OH) og
 1730 cm⁻¹ (ester C=O). PMR (CDCl₃) 3,93-4,27 (m, 3H),

21

3,17 (d, 2H), 2,50 (d, 2H), 1,50-1,87 (m 2H), 1,30
(bs, 12H), 0,93 (m 3H).

Omdannelse af octyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat(IX) til
5 L-carnitin.



20

En 25% opløsning af trimethylamin i vand (8 ml)
blev tilsat til en opløsning af IX (1,593 g) i methanol
(15 ml). Blandingen henstod under omrøring i 20 timer
ved 27°C. Opløsningsmidlerne og overskuddet af trime-
25 thylamin blev afdrevet under reduceret tryk, hvorved
der fremkom et semikrystallinsk, fast stof, X. Denne
remanens blev vasket med små mængder ether for at fjerne
octanol og derefter opløst i vand og ført gennem "Dowex
1-x4 kolonne [OH⁻ form, 50-100 mesh., kolonnevolumen
30 2,5 x 15 cm]. Kolonnen blev vasket med destilleret vand.
Fjernelse under vakuum af opløsningsmidlet fra de før-
ste 200 ml eluat gav L-carnitin som et hvidt krystal-
linsk, fast stof (490 mg, 65% udbytte) $[\alpha]_D^{23} -29,2^\circ$
(c, 6,5 H₂O).

35

Eksempel 371

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev
gentaget med brug af hexyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat

til opnåelse af hexyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som derefter blev omdannet til L-carnitin.

Eksempel 372

5 Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev gentaget med brug af heptyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat til opnåelse af heptyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som derefter blev omdannet til L-carnitin.

10 Eksempel 373

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev gentaget med brug af decyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat til opnåelse af decyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som derefter blev omdannet til L-carnitin.

15

Eksempel 374

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev gentaget med brug af methyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat (VIII) til opnåelse af methyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som derefter blev omdannet til L-carnitin.

20

Eksempel 375

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev gentaget med brug af ethyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat til opnåelse af ethyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som derefter blev omdannet til L-carnitin.

25

Eksempel 376

Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev gentaget med brug af n-propyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat til opnåelse af n-propyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som efterefter blev omdannet til L-carnitin.

30

Eksempel 377

35 Den samme fremgangsmåde som i eksempel 370 blev gentaget med brug af n-butyl-4-chlor-3(R)-hydroxybutyrat til opnåelse af n-butyl-4-iod-3(R)-hydroxybutyrat, som derefter blev omdannet til L-carnitin.

Repræsentative gær og fungi, der danner det ønskede enzym, er opstillet i henholdsvis tabel 1 og tabel 2.

5 Tabel 1 (Gær)

1. Candida lipolytica NRRL Y-1095
2. Candida pseudotropicalis NRRL Y-1264
3. Mycoderma cerevisiae NRRL Y-1615
- 10 4. Torula lactosa NRRL Y-329
5. Geotrichum candidum NRRL Y-552
6. Hansenula anomala NRRL Y-366
7. Hansenula subpelliculosa NRRL Y-1683
8. Pichia alcoholophila NRRL Y-2026
- 15 9. Saccharomyces cerevisiae NRRL Y-12,632
10. Saccharomyces lactis NRRL Y-1140
11. Zygosaccharomyces priorianus NRRL Y-12,624 12.
12. Saccharomyces acidifaciens NRRL Y-7253
13. Kloeckera corticis ATCC 20109
- 20 14. Cryptococcus mascerans ATCC 24194
15. Rhodotorula sp. ATCC 20254
16. Candida albicans ATCC 752
17. Dipodascus albidus ATCC 12934
18. Saccharomyces cerevisiae (commercial Red Star)
- 25 19. Rhodotorula rubra NRRL Y-1592
20. Oospora lactis ATCC 14318

NRRL - Northern Regional Research Lab. at Peoria,
Illinois.

30 ATCC - American Type Culture Collection at Rockville,
Maryland.

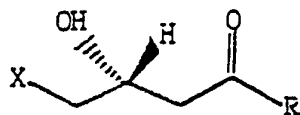
Tabel 2 (Fungi)

1. Gliocladium virens ATCC 13362
2. Caldariomyces fumago ATCC 16373
- 5 3. Linderina pennisopora ATCC 12442
4. Aspergillus ochraceus NRRL 405
5. Trichoderma lignorum ATCC 8678
6. Heterocephalum autantiacum ATCC 16328
7. Entomophthora coronata NRRL 1912
- 10 8. Scopulariopsis constantini NRRL 1860
9. Zygorhynchus heterogamus ATCC 6743
10. Scopulariopsis brevicaulis NRRL 2157
11. Rhizopus arrhizus NRRL 2286
12. Penicillium thomii NRRL 2077
- 15 13. Mucor hiemalis (-) NRRL 4088
14. Byssochlamys nivea ATCC 12550
15. Penicillium patulum NRRL 1952
16. Metarrhizium anisopliae ATCC 24942
17. Penicillium islandicum ATCC 10127
- 20 18. Cunninghamella elegans ATCC 10028a
19. Cunninghamella echinulata ATCC 11585a
20. Aspergillus fumigatus ATCC 16907
21. Aspergillus amstelodami NRRL 90
22. Gliocladium roseum ATCC 10521
- 25 23. Aspergillus giganteus ATCC 10059
24. Absidia blakeleeana ATCC 10148b
25. Penicillium roqueforti NRRL 849a

P A T E N T K R A V

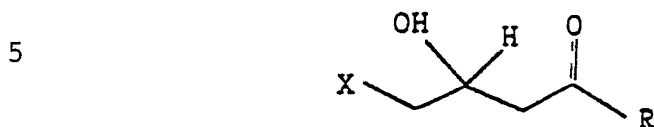
1. Forbindelser med følgende formler, hvoraf
bl.a. 3(R) konfigurationen fremgår

5



- i hvilken X betegner Cl, Br, I eller OH og
R betegner en alkoxygruppe med mellem 1 og 15
carbonatomer,
phenoxy- eller phenylalkoxygruppe med mellem
7 og 14 carbonatomer eller en phenylaminogruppe.
2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner en ligekædet alkoxygruppe med
mellem 1 og 10 carbonatomer.
3. Forbindelse ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner $\text{OC}_{10}\text{H}_{21}$.
4. Forbindelse ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner OC_8H_{17} .
5. Forbindelse ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner OC_7H_{15} .
6. Forbindelse ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner OC_6H_{13} .
7. Forbindelse ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner en alkoxygruppe med mellem
1 og 4 carbonatomer.
8. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner en phenoxy- eller phenyl-
alkoxygruppe, substitueret med en halogen-, nitro-
eller lavere alkylgruppe.
9. Forbindelse ifølge krav 8, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner benzyloxygruppen, og X be-
tegner Cl eller Br.
10. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at R betegner phenylaminogruppen, og X be-
tegner Cl eller Br.

11. Fremgangsmåde til fremstilling af optisk aktive γ -substituerede β -hydroxybutansyrederivater med formlen



i hvilken X betegner Cl, Br, I eller OH, og

R betegner en alkoxygruppe med mellem 1 og 15

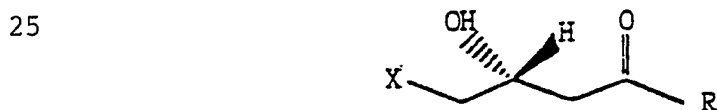
10 carbonatomer,

phenoxy- eller phenylalkoxygruppe med mellem

7 og 14 carbonatomer eller en phenylaminogruppe

ud fra de tilsvarende γ -substituerede aceteddikesyre-
 15 estere eller -amider, k e n d e t e g n e t ved, at de γ -substituerede aceteddikesyreestere eller -amider udsættes for fermentativ enzymatisk behandling med en mikroorganisme, der danner L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35], og udvinding af det ønskede optisk
 20 aktive γ -substituerede β -hydroxybutansyrederivat.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 11 til fremstilling af optisk aktive γ -substituerede 3(R)-hydroxybutansyrederivater med følgende formel, hvoraf bl.a. 3(R) konfigurationen fremgår



i hvilken X og R har de ovenfor fastlagte betydninger, hvor R indeholder mellem 5 og ca. 15 carbonatomer, hvis
 30 det betegner en alkoxygruppe, k e n d e t e g n e t ved, at en forbindelse med formlen



i hvilken X og R har de ovenfor fastlagte betydninger, udsættes for fermentativ enzymatisk påvirkning af en

mikroorganisme, der danner L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [EC 1.1.1.35], og de ønskede optisk aktive 4-substituerede 3(R)-hydroxybutansyrederivater fra den fermentative reaktionsblanding udvindes.

- 5 13. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e -
t e g n e t ved, at mikroorganismen er valgt fra
klassen Ascomycetes.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e t e g -
n e t ved, at mikroorganismen er valgt fra en af fa-
10 milierne Endomycetales, Mucorales, Moniliales eller
Eurotiales.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e -
t e g n e t ved, at mikroorganismen er valgt fra fami-
lien af Saccharomyces.

- 15 16. Fremgangsmåde ifølge krav 15, k e n d e -
t e g n e t ved, at mikroorganismen er Saccharomyces
cerevisiae.

17. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e -
t e g n e t ved, at det γ -substituerede aceteddike-
20 syrederivat, der udsættes for fermentativ enzymatisk
påvirkning er γ -chloraceteddikesyreoctylester.

18. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e -
t e g n e t ved, at det γ -substituerede aceteddike-
syrederivat, der udsættes for fermentativ enzymatisk
25 påvirkning, er γ -chloraceteddikesyrebenzylester.

19. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e -
t e g n e t ved, at det γ -substituerede aceteddikesyre-
derivat, der udsættes for fermentativ enzymatisk på-
virkning, er γ -chloracetoacetanlid.

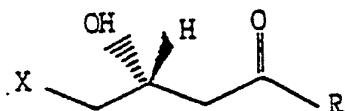
- 30 20. Fremgangsmåde ifølge krav 17, k e n d e -
t e g n e t ved, at mikroorganismen er Saccharomyces
cerevisiae.

21. Fremgangsmåde ifølge krav 18, k e n d e -
t e g n e t ved, at mikroorganismen er Saccharomyces
35 cerevisiae.

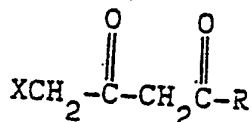
22. Fremgangsmåde ifølge krav 19, k e n d e -
t e g n e t ved, at mikroorganismen er Saccharomyces
cerevisiae.

23. Fremgangsmåde ifølge krav 11 til fremstilling af optisk aktive γ -substituerede 3(R)-hydroxybutansyrederivater med følgende formel, hvoraf bl.a. 3(R) konfigurationen fremgår

5



i hvilken X har den ovenfor fastlagte betydning, og R
10 betegner en alkoxygruppe med mellem 1 og 4 carbonatomer, k e n d e t e g n e t ved, at en forbindelse med formelen



15

i hvilken X og R har de ovenfor fastlagte betydninger udsættes for enzymatisk påvirkning af L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase[EC 1.1.1.35] i oprenset form, og udvinding af de ønskede optisk aktive γ -substituerede
20 3(R)-hydroxybutansyrederivater fra den enzymatiske reaktionsblanding.

24. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at L- β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasen [EC 1.1.1.35] på oprenset form er isoleret fra svine-
25 hjerner.