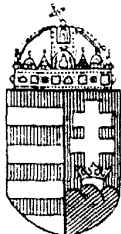


(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201 296 B

(22) Bejelentés napja: 1986.02.12.

(21) 609/86

(33) GB

(32) 1985.02.13., 1985.10.16.

(31) 8503665, 8525456

(51) Int Cl⁵

C 07 C 93/06

C 07 C 103/18

C 12 P 17/02

(41) (42) Közzététel napja: 1986.11.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.10.28. SZKV 90/10.

(72) Feltalálók:

Phillips Gareth Thomas,
Robertson Brian William, Hága
Bertola Mauro Attilio,
Koger Hein Simon,
Marx Arthur Friedrich, Delft,
Watts Peter Douglas, Hága, (NL)

(73) Szabadalmazók:

Gist-Brocades N.V., Delft, Shell International Research Maatschappij B.V., Hága (NL)

(54) ELJÁRÁS 3-SZUBSZTITUÁLT-1-(ALKIL-AMINO) -2-PROPANOLOK SZTEREOSPECIFIKUS ELŐÁLLÍTÁSÁRA

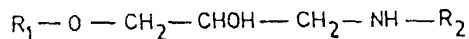
(57) KIVONAT

A találmány tárgya új eljárás az (I) általános képletű vegyületek sztereospecifikus formában való előállítására.

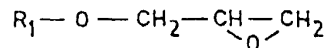
Az I általános képletű vegyületeket – ahol R₁ adott esetben karbamoil-(1–4 szénatomos)alkilcsoporttal, vagy (1–4 szénatomos alkoxi-(1–4 szénatomos)alkilcsoporttal szubsztitult fenilcsoport; és R₂ 2–6 szénatomos alkilcsoport – úgy állítják elő, hogy (III) általános képletű ve-

gyületeket alkalmas mikroorganizmusokkal sztereoselektíven legalább 80–90%-ban S-konfigurációjú (II) általános képletű vegyületekké epoxidálnak, majd ezeket 2–6 szénatomos alkil-aminokkal reagáltatva (I) általános képletű vegyületekké alakítják.

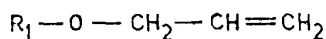
Az (I) általános képletű vegyületek béta-adrenerg receptor blokkoló tulajdonságúak.



(I)



(II)



(III)

A leírás terjedelme: 10 oldal, 7 ábra

HU 201 296 B

A találmány tárgya új eljárás az (I) általános képletű 3-szubsztituált-1-(alkil-amino)-2-propamol-származékok vagy gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sóik – a képletben

R₁ jelentése fenilcsoport vagy 4-es helyzetben karbamoil-1-(1–4 szénatomos)alkil- vagy (1–4 szénatomos)alkoxi-(1–4 szénatomos)alkilcsoporttal szubsztituált fenilcsoport,

R₂ jelentése 2–6 szénatomos alkilcsoport – sztereospecifikus formában való előállítására, oly módon, hogy egy (III) általános képletű vegyületet olyan mikroorganizmus hatásának tesszük ki, amely képes egy (III) általános képletű vegyületet sztereoselektíven legalább 80 tömeg%-ban S-konfigurációjú (II) általános képletű fenil-(2,3-epoxi-1-propil)-éterre oxidálni, a kapott (II) általános képletű vegyületet 2–6 szénatomos alkil-aminnal reagáltatjuk, és az (I) általános képletű vegyületet elkülönítjük és/vagy az (I) általános képletű vegyületet gyógyszerészetileg elfogadható sójává alakítjuk.

A továbbiakban a 2,3-epoxi-1-propil-csoportot glicidilként nevezzük.

Általánosan ismeretes, hogy számos biológiailag aktív vegyület sztereoizomerek elegyeként létezik. Leggyakrabban ezeket az elegyeket alkalmazzák mezőgazdasági és gyógyszerészeti felhasználásoknál. A fő ok az, hogy az elválasztási költségek nagyobbak a hatásmenyekeedés potenciális hasznánál. Általában a kívánt biológiai hatással az egyik sztereoizomer rendelkezik, így legjobb esetben az elegy hatásossága felére csökken. Kétségtelen azonban, hogy a modern farmakológusok az elegyek beadására vonatkozólag egyre inkább más nézeteket valának, amennyiben egy vagy több sztereoizomert szennyezésnek tekintenek, amely nemhogy nem rendelkezik a kívánt gyógyászati hatással, hanem nagyonis más nemkívánt fiziológiai hatásai vannak, például toxikus. Számos példát idéznek a biológiai hatás egyetlen sztereoizomerrel való összefüggésének szemléltetésére.

A gyógyszerészeti területen a legtöbb béta-adrennerg blokkoló szert elegyként árulják, bár a hatás egy sztereoizomerre korlátozódik. A labetalol néven ismert hatóanyag például kombinált alfa-adrennerg blokkoló és béta-adrennerg blokkoló hatással rendelkezik, amely hatásról kimutatták, hogy négy izomer elegyből csak két különálló párnak tulajdonítható. N. Toda és munkatársai közölték a J.Pharmacol.Exp.Ther. 207, 311 (1978)-ban, hogy a (-)-metoprolol 270-380-szor hatásosabb, mint a (+)-metoprolol a nyúl szívritmus és légző izmoknak izoprottereholra (béta-adrennoreceptor stimuláns) való válaszában csillapításában. Metoprolol: 1-(izopropil-amino)-3-(4-(2-metoxi-etil)-fenoxi)-2-propanol.

Egyetlen sztereoizomer béta-blokkolóhoz vezető jelenleg szokásos előállítás módszerek vagy kémiai resolválások vagy sztereoizomer prekursorokból kiinduló meglehetősen hosszadalmas kémiai szintézisek, amelyeket például a 4 408 063 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és a J. Org. Chem. 41 3121 (1976)-ban L.M. Weinstok és munkatársai írnak le. Így ezeknek a leírt eljárásoknak az analógiájára a metoprolol S-

enantiomerét (optikailag aktív sztereoizomerét) ipari méretekben gazdaságilag nem előnyös előállítani. Ennélfogva a jelen találmány célja az, hogy ilyen sztereoizomerek előállítására olyan termelékeny eljárást biztosítson, amely ipari méretekben gazdaságilag kedvezően kivitelezhető.

J. Tramper és munkatársai bemutatták mikroorganizmusok azon képességét, hogy rövidszénláncú (1–4 szénatomos) alkéneket gáz/szilárdfázisú vagy két folyadékfázisú bioreaktorban sztereospecifikusan a megfelelő epoxi-alkánokká alakítanak át, (3rd European Congress on Biotechnology, München, 1984. szeptember 10-14.) Epoxi-alkánok mikrobiológiai előállítására egy másik példát a 4,106,986 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban közölnek, ahol 1–20 szénatomot tartalmazó egyenesláncú 1-lakének 1,2-epoxi-alkánokká való átalakítását írják le. A 0099609 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentésben példákat adnak meg propén és 1-oktén megfelelő epoxi-alkánokká való átalakítására. Szubsztituált alkének, például (III) általános képletű éter-származékok átalakítása azonban semmiképp sem vezethető le ezekből az ismert eljárásokból, amelyek csak egyenesláncú vagy néha elágazó láncú alkénekre alkalmazhatók.

Kiterjedt kutatás és kísérletezés eredményeként egy tökéletesített szintézist fedezhetünk fel az (I) általános képletű vegyület S-enantiomerének (III) általános képletű vegyületből való előállítására, amelynek során olyan baktériumokat használunk fel, melyek képesek (III) általános képletű vegyületet legalább 80 tömeg%-ban S-konfigurációjú (II) általános képletű vegyületekké epoxidálni, és az illető (II) általános képletű vegyületet valamilyen alkil-aminnal reagáltatva megfelelő (I) általános képletű vegyületté alakítjuk.

Részletebben kifejtve a jelen találmány tárgya eljárás (I) általános képletű gyógyszerileg hatásos vegyületek vagy gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sóik sztereospecifikus formában való előállítására, amelyek képletében

R₁ jelentése fenilcsoport vagy 4-es helyzetben karbamoil-1-(1–4 szénatomos)alkil- vagy (1–4 szénatomos)alkoxi-(1–4 szénatomos)alkil-csoporttal szubsztituált fenilcsoport,

és R₂ jelentése 2–6 szénatomot tartalmazó alkilcsoport –

amelyre az jellemző, hogy egy (III) általános képletű vegyületet – amely képletben

R₁ jelentése az előbb megadottakkal azonos –

(III) általános képletű vegyületek legalább 80 tömeg%-ban S-konfigurációjú (II) általános képletű vegyületekké való sztereoselektív epoxidálására képes mikroorganizmus hatásának tesszük ki, a (II) általános képletű vegyületet esetleg elkülönítjük, és a (II) általános képletű vegyületet egy 2–6 szénatomos alkil-aminnal reagáltatjuk, elkülönítjük az (I) általános képletű vegyületet, és/vagy gyógyszerészetileg elfogadható sójává alakítjuk át. Az alkalmazott alkil-amin előnyösen izopropil-amin vagy tercier butil-amin.

Az R₁ csoport előnyös jelentése 4-(karbamoil-metil)-fenil-, fenil-, vagy 4-(2-metoxi-etil)-fenil-, csoport.

A jelen találmány szerinti eljárást előnyösen olyan (III) általános képletű vegyületekből kiindulva hajtjuk végre, amelyek képletében R₁ jelentése 4-(2-metoxi-etil)-fenil-, 4-(karbamoil-metil)-fenil-, fenil-csoport, és még előnyösebben olyan (III) általános képletű vegyülettel, amelynek képletében R₁ jelentése 4-(2-metoxi-etil)-fenilcsoport. Egy előnyös megvalósításban az eljárást oly módon hajtjuk végre, hogy olyan mikroorganizmusokat alkalmazunk, amelyek legalább 90 tömeg% S-konfigurációjú vegyületet termelnek.

A mikroorganizmus *Nocardia corallina*, *Rhodococcus* sp. (NCIB 11277), *Mycobacterium rhodochrous*, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium* WM1 (NCIB 11626). A mikroorganizmusokat adott esetben valamilyen polimer gélhez kötjük. Az allil-(4-(2-metoxi-etil)-fenil)-éter epoxidálására alkalmas mikroorganizmusok a *Nocardia corallina* fajhoz (a faj mintáját az ATCC-ben 31338 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe), *Rhodococcus* sp. fajhoz (NCIB 11277), *Mycobacterium rhodochrous* fajhoz (a faj mintákat az NCIB-ben 9703 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe), *Rhodococcus equi* fajhoz (a faj mintáját az NCIB-ben 12035 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe), *Pseudomonas aeruginosa* fajhoz (a faj mintáját az NCIB-ben 12036 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe), *Pseudomonas oleovorans* fajhoz (a faj mintáját az ATCC-ben 29347 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe), *Pseudomonas putida* fajhoz (a faj mintáját az NCIB-ben 9571 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe) és a *Pseudomonas aeruginosa* fajhoz (a faj mintáját az NCIB-ben 8704 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe) tartoznak.

Az allil-fenil-éter epoxidálására alkalmas mikroorganizmus a *Mycobacterium* WM1 (NCIB 11626) nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe) tenyésztéséhez tartoznak.

A 4-(allil-oxi-fenil)-acetamid epoxidálására alkalmas mikroorganizmusok a *Pseudomonas oleovorans* faj (a faj mintáját az ATCC-ben 29347 nyilvántartási szám alatt helyezték letétbe) tenyésztéséhez tartoznak.

A jelen találmány szerinti eljárás előnyös megvalósításának gyakorlatában allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter legalább 90 tömeg%-ban S-konfigurációjú glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre való átalakítására képes mikroorganizmust kell szelektálni az előbb említett mikroorganizmusokból 0,5–10 napig tenyészteni kell, majd a bakteriumsejteket el kell különíteni a tenyészfolyadékából, a sejteket folyékony táptalajban kell szuszpendálni, és az allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert a sejtek hatásának kell kitenni.

A jelen találmányban felhasznált, epoxidáló hatást mutató mikroorganizmusokat körülbelül 0,5–10 napig tenyészteni kell, majd a sejteket valamilyen folyékony táptalajban, előnyösen valamilyen folyékony minimál táptalajban kell szuszpendálni, és a (III) általános képletű vegyületet a sejtek hatásának kell kitenni. Az előbb említett körülbelül 0,5–10 napos tenyésztés után a sejteket elkülönítjük a tenyésztaptalajtól, mielőtt a sejteket a minimál tápta-

lajban szuszpendáljuk. A (III) általános képletű vegyületek sztereoselektív epoxidálására használt mikroorganizmusok tenyésztésére valamilyen asszimilálható szénforrást (például glükózt, tejsavat, szénhidrogéneket, így tetradecént stb.), valamilyen nitrogénforrást (például ammónium-szulfátot, ammónium-nitrátot, ammónium-kloridot stb.), valamilyen szerves hatóanyagkivonatot (például élesztőkivonatot, malátakivonatot, peptont, húskivonatot stb.) és valamilyen szerves tápanyagforrást (például foszfátot, magnéziumot, káliumot, cinket, vasat és más fémeket nyomnyi mennyiségben) tartalmazó közönséges táptalajt használhatunk. Adott esetben valamilyen indukáló anyagot (például dietoxi-metánt) is adunk a tápoldathoz. A hőmérsékletet 0 °C és 45 °C között és a pH-t 3,5 és 9 között tartjuk a mikroorganizmusok tenyésztése közben. A mikroorganizmusokat előnyösen 20 °C és 37 °C közötti hőmérsékleten és 5 és 8 közötti pH-nál tenyésztjük.

A mikroorganizmusok tenyésztése alatt szükséges aerob körülmények bármely jól megtervezett módszerrel fenntarthatók, feltéve hogy az oxigénellátás elegendő a mikroorganizmusok anyagcsere-szükségletének kielégítésére. Ez legkönnyebben a gázalakú oxigén, előnyösen levegő formájában való biztosításával érhető el.

A (III) általános képletű vegyület (II) általános képletű vegyületté való átalakítása alatt a mikroorganizmusok növekedési szakaszban vannak, és az előbb említett közönséges táptalajt hasznosítják. A mikroorganizmusok valamilyen koszubsztráttal is elláthatók.

A (III) általános képletű vegyület (II) általános képletű vegyületté való átalakítása alatt a mikroorganizmusok előnyösen lényegében nem növekedési szakaszban tarthatók valamilyen minimál táptalaj alkalmazásával. Minimál táptalajként szükség esetén valamilyen asszimiláló szénforrást (például glükózt, laktátot, szénhidrogéneket, így tetradecént stb.), szükség esetén valamilyen nitrogénforrást (például ammónium-szulfátot, ammónium-nitrátot, ammónium-kloridot stb.), szükség esetén valamilyen szerves hatóanyagforrást (például élesztőkivonatot, malátakivonatot, peptont, húskivonatot stb.) és szükség esetén valamilyen szerves tápanyagforrást (például foszfátot, magnéziumot, káliumot, cinket, vasat és más fémeket nyomnyi mennyiségben) tartalmazó közönséges tenyésztő táptalaj használható. A mikroorganizmusok a nem növekedési szakaszban tarthatók például az asszimilálható szénforrás megvonásával vagy a nitrogénforrás megvonásával. A hőmérsékleten ebben a szakaszban 0 °C és 45 °C között és a pH-t 3,5 és 9 között tartjuk. A mikroorganizmusokat előnyösen 20 °C és 37 °C közötti hőmérsékleten és 5 és 8 közötti pH-nál tartjuk. Az ebben az szakaszban szükséges aerob körülmények az előbb említett eljárásokkal tarthatók fenn, feltéve hogy az oxigénellátás elegendő a mikroorganizmusok anyagcsere-szükségletének kielégítésére, valamint a (III) általános képletű vegyületek (II) általános képletű vegyületekké való átalakításához. A mikroorganizmusok által termelt (II) általános képletű vegyület, amint előbb említettük, bármely megfelelő eljárás-

sal elkülöníthető és megtisztítható.

A jelen találmány szerint előállított (IIa) és (IIb) általános képletű vegyületek – amely képletben

R₁ jelentése az (I) általános képletnél megadottakkal azonos –

vagy ezek elegyei izopropil-aminnal vagy tercier-butil-aminnal reagáltatva (Ia), (Ib) általános képletű vegyületekké, illetve ezek elegyével alakíthatók át. Az (S) abszolút konfigurációjú béta-adrenerg receptor blokkoló ágensek (S) abszolút konfigurációjú aril-glicidil-éterekből való előállítási reakciójára a 2453324 számú nyilvánosságra hozott német szövetségi köztársasági szabadalmi bejelentésben írnak le egy példát.

Különösen a túlnyomórészt (Ib) általános képletű vegyületeket tartalmazó keverékek használhatók előnyösen gyógyszerkészítményekben. Előnyösen a legalább 80 tömeg%-ban és még előnyösebben a legalább 90 tömeg%-ban S-konfigurációjú vegyületek használhatók gyógyszerkészítményekben. Az (I) általános képletű vegyületek vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóik, így savaddíciós sóik béta-adrenerg receptor blokkoló tulajdonsággal rendelkeznek. A gyógyszerészetileg elfogadható sókra példák a Metoprololból és L-borkósavból előállított Metoprolol-tartarát és a 3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanolból és sósavból előállított 3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanol-hidroklorid. Előnyösen azokat a béta-adrenerg receptor blokkoló vegyületeket állítjuk elő a jelen találmány szerinti eljárással, amelyek legalább 80 tömeg%-ban és előnyösebben legalább 90 tömeg%-ban S-konfigurációban képződnek.

Az optikai tisztaságot, amit a továbbiakban a részletes leírásban említjük, az enantiomer-felesleg százalékában fejezzük ki: S – R/S + R.

A jelen találmányt a továbbiakban a példákkal és a mellékelt ábrákkal részletesebben szemléltetjük, anélkül azonban, hogy a jelen találmány oltalmi köre csak ezekre a példákra korlátozódna.

Az ábrák rövid magyarázata:

1. ábrák (+) és (±)-glicidil[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter európium shift-reagens jelenlétében felvett részleges Protonmágneses rezonanciáspektrumait ábrázolják.

1.a) ábra: (±)- vagy (+)-glicidil[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter shift-reagens nélkül.

1.b) ábra: (±)-Glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter Eu(hfc)₃ reagenssel. Eu(hfc)₃ és (±)-glicidil[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter aránya = 0,10.

1.c) ábra: (+)-Glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter Eu(hfc)₃ reagenssel. Eu(hfc)₃ és (+)-glicidil[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter aránya = 0,12.

2. ábra: (-)-Metoprolol protonmágneses rezonanciáspektruma.

3. ábra: (-)-Metoprolol C.I. (CH₄)-gyel meghatározott tömegspektruma.

4. ábra: Fenil-glicidil-éter előállítása Mycobacterium WMF-gyel nagy mértékben (2,25 liter) kétfázisú rendszerben. [750 ml sejt (6,9 g/liter száraz tömeg) + 1500 ml 2,5% allil-fenil-étert tartalmazó izooktán]. Az ábrán a fekete négyzetek a fenil-glicidil-éter koncentrációt mutatják az izooktán rétegben. A körök a párhuzamosan végzett kontrollkísérletben (4 ml sejt + 10 ml 2,5% allil-fenil-étert tartalmazó izooktán) keletkező fenil-glicidil-éter koncentrációját mutatják.

sérletben (4 ml sejt + 10 ml 2,5% allil-fenil-étert tartalmazó izooktán) keletkező fenil-glicidil-éter koncentrációját mutatják.

5. ábra: (-)-3-Fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanol protonmágneses rezonanciáspektruma.

6. ábra: (-)-3-Fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanol C.I. (CH₄)-gyel felvett tömegspektruma.

1. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre Rhodococcus equi NCIB 12035-tel.

Rhodococcus equi NCIB 12035 30 °C-on 1 ml tetradekánon 0,02% élesztő kivonatot tartalmazó 100 ml ASM ásványi sós táptalajon növesztett 72 órás tenyészetét biomaszájának körülbelül a felét átvisszük egy 250 ml-es Erlenmeyer lombikba, amely 0,02% élesztő kivonatot tartalmazó 50 ml ASM táptalajt, 0,15 ml tetradekánt, 1 ml oktánt, 0,05 ml Tween-80-t és 0,05 ml allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert tartalmaz. A lombik tartalmát 30 °C-on körkörös rázógépen inkubáljuk, és mintákat veszünk, amelyeket diklór-metánnal való extrahálás után Varian 3700 gázkromatográfon analizálunk. (Oszlop: 3% OVI WHP 100–120-on; 50 cm hossz; 2 mm belső átmérő; 100 °C-tól 200 °C-ig 10 °C/perc; N₂ 30 ml/perc).

ASM táptalaj: 0,535 g/liter ammónium-klorid; 0,531 g/liter kálium-dihidrogén-foszfát; 0,866 g/liter dinátrium-hidrogén-foszfát; 0,174 g/liter kálium-szulfát; 0,037 g/liter magnézium-szulfát-heptahidrát; 0,00735 g/liter kalcium-klorid-dihidrát; 1,0 ml/liter TK₃ nyomelem oldat és 1,0 ml/liter 0,1 mólos vas(II)-szulfát-heptahidrát oldat.

A TK₃ nyomelem oldat 0,288 g/liter cink-szulfát-heptahidrátot, 0,224 g/liter mangán-szulfát-tetrahidrátot, 0,0618 g/liter bórsavat, 0,1248 g/liter réz-szulfát-pentahidrátot, 0,0484 g/liter nátrium-molibdenát-dihidrátot, 0,0476 g/liter kobalt(II)-klorid-hexahidrátot, 0,083 g/liter kálium-jodidot és 1 ml/liter 1 mólos kénsavoldatot tartalmaz; pH = 7,0.

A termék, a (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter 48 óra inkubálás után jelenik meg, és 96 óráig növekszik a mennyisége, amíg az epoxid körülbelül a megmaradó allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter mennyiségnek körülbelül 15%-át éri el.

Megfelelő mennyiségű (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter összegyűjtése céljából 10 x 50 ml és 5 x 500 ml (előbb leírt körülmények között készített) tenyészetet 350 ml diklór-metánnal extrahálunk. Az extraktumot nátrium-szulfáton szárítjuk, az oldószert eldesztilláljuk, és az epoxidot szilikagélen hexán/dietil-éter gradienssel eluálva tisztítjuk. A 30% dietil-étert tartalmazó elegy eluálja az epoxidot. Ily módon 353 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert kapunk. [α]_D²⁵ = +8,11° (c = 0,95; etanol).

A (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter optikai tisztaságát protonmágneses rezonanciáspektroszkópiával vizsgáljuk trisz[3-(heptafluorpropil-hidroxi-metilén)-d-kámforato]-europium(III) Eu(hfc)₃ shift reagens jelenlétében (lásd 1. ábra). A shift reagens hozzáadására a kémiaiag szintetizált (±)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterben lévő egyes geminális protonokból származó

zó jelek burkoló görbéje (lásd 1.a. ábra (a) és (b) jelzése) lefelé eltolódik, és mindegyikük két egyenlő intenzitású sávra hasad fel (lásd 1.b. ábra (a) + (b)). A mikrobiológiailag előállított (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterben lévő geminális protonok mindegyikéből ugyanilyen körülmények között azonban csak egy jelgörbe észlelhető (lásd 1.c. ábra (a) + (b)). Így mikrobiológiai epoxidálással kapott (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter optikai tisztasága a protonmágneses rezonanciaspektroszkópiás mérések kísérleti hibáján belül 100%-nak vehető.

2. példa

(+)-Glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása (-)-metoprolollá.

290 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter (lásd 1. példa) 6,2 ml vízmentes etanollal és 1,84 ml izopropil-aminnal készített oldatát visszafolyatódó hűtő alatt 3 óra hosszat forraljuk, majd az oldószereket eldesztilláljuk. A kapott olajat 10 ml diklór-metánban oldjuk, és 10 ml 0,2 n sósavoldatba extraháljuk, amelyet utána 2 x 10 ml diklór-metánal mosunk. A savas oldatot 3 ml 2 n nátrium-hidroxid oldattal meglúgosítjuk, és a terméket 10 ml diklór-metánba extraháljuk. A diklór-metános extraktumot nátrium-szulfáton szárítjuk, és az oldószert eldesztillálásával ragacsos szilárd anyaghoz jutunk. A terméket hexánból átkristályosítva 260 mg (-)-metoprololt kapunk, amelynek olvadáspontja 42–45 °C; $[\alpha]_D^{25} = -5,46^\circ$ ($c = 1,01$; etanol). A kémiai úton előállított ($\pm$)-metoprolol olvadáspontja 49–51 °C, és optikailag inaktív, amint várható.

A (-)-metoprolol protonmágneses rezonanciaspektroma és tömegspektroma (2. és 3. ábrák) és a ($\pm$)-metoprolol hasonló adatai (itt nem mutatjuk be külön) egyeznek a kívánt szerkezettel, és megkülönböztethetetlenek a metoprolol-tartarát kereskedelmi mintából extrahált ($\pm$)-metoprolol (olvadáspont: 48,5–50,5 °C) protonmágneses rezonanciaspektromtól.

A (-)-metoprolol optikai tisztaságát S-leucil-diasztereomer amid-származékának fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) oszlopon [Lichrosorb RP8 (10 μ m), 25 cm x 1/4 (0,635 cm) külső átmérő, 4,9 cm belső átmérő, mozgó fázis: 40% acetonnitril 3,0 pH-jú 0,1 mólos nátrium-foszfát pufferban, 2,5 ml/perc, U.V. detektálás] végzett elválasztásával határozzuk meg. A származékot úgy állítják elő, hogy metoprololt (terc-butoxi-karbonil)-S-leucin (BOC-S-leucin) szimmetrikus anhidridjével reagáltatunk, majd ezt követően a BOC-csoportot trifluor-ecetsavval eltávolítjuk, ahogy J. Hermansson és C.J. Von Bahr a J.Chrom., 227, 113 (1982)-ben leírják. A ($\pm$)-metoprololból készített hasonló minta analízise két egyenlő intenzitású csúcsot eredményez, amint ez racemát esetében várható. A (-)-metoprololból készített minta 97,7 : 2,3 intenzitásarányú két csúcsot eredményezett, ami 95,4%-os optikai tisztaságnak felel meg.

3. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása

(+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 12036-tal, majd ezt követően ennek átalakítása (-)-metoprolollá.

Pseudomonas aeruginosa NCIB 12036 szuszpenziót készítünk úgy, hogy 0,75% nátrium-laktátot és 0,05% dietoxi-metánt tartalmazó ASM ásványi sók táptalajban 24 óráig 30 °C-on tenyésztett sejteket az eredeti sejtenyészet térfogata egytizedének megfelelő ASM táptalajban reszuszpendálunk.

1100 ml ilyen sejtsuszpenziót 3,3 g allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterrel 30 °C-on 220 ford./percnél inkubálunk. A reakcióelegyet 24 óra múlva 500 ml diklór-metánnal extraháljuk, az extraktumot nátrium-szulfáton szárítjuk, és az oldószert ledesztillálása után 2,67 g olajat kapunk. Szilikagélén végzett tisztítás (lásd 1. példa) 930 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert eredményez; $[\alpha]_D^{25} = +8,21^\circ$ ($c = 0,943$; etanol).

Az Eu(hfc)_3 eurórium shift-reagens jelenlétében protonmágneses rezonanciaspektroszkópiával mért optikai tisztaság (lásd 1. példában) a protonmágneses rezonanciaspektrom mérések kísérleti hibáján belül 100%-nak bizonyul.

694 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterből (a 2. példában leírt módszer szerint) 579 mg (-)-metoprololt állítunk elő, amelynek olvadáspontja 44–46 °C; $[\alpha]_D^{25} = -5,49^\circ$ ($c \approx 1,02$; etanol). Az optikai tisztaság (a 2. példában leírt módszerrel meghatározva) 98%-nak bizonyul. Az anyalúg kristályosításával 113 mg (-)-metoprololt kapunk, amelynek optikai tisztasága 96%.

4. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 8704-gyel (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre, majd ennek átalakítása (-)-metoprolollá.

200 ml *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 8704 sejtsuszpenziót (készítés a 3. példában leírtak szerint) inkubálunk 2 g allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterrel 30 °C-on 24 óráig, majd a szuszpenziót (a 3. példában leírtak szerint) extraháljuk, és tisztítjuk. Így módon 91 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert kapunk. Az epoxid Eu(hfc)_3 eurórium shift-reagens jelenlétében protonmágneses rezonanciaspektroszkópiával mért optikai tisztasága (lásd 1. példa) a protonmágneses rezonanciaspektroszkópiás mérések hibáin belül 100%-nak bizonyul.

76 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterből (a 2. példában leírt módszer felhasználásával) 55 mg (-)-metoprololt állítunk elő, amelynek olvadáspontja 42–45 °C $[\alpha]_D^{25} = -4,93^\circ$ ($c = 0,944$; etanol), S-leucil-diasztereomer származékának (a 2. példában leírtak szerint) nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával meghatározott optikai tisztasága 98,8%. Az anyalúg bepárlásával 17 mg 95,2% optikai tisztaságú (-)-metoprololt kapunk.

5. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása *Pseudomonas putida* NCIB 9571-gyel (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre, majd ennek átalakítása (-)-metoprolollá.

200 ml (a 3. példában leírtak szerint készített)

Pseudomonas putida NCIB 9571 sejtuszpenziót 1 g allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterrel 30 °C-on 24 óra hosszat inkubálunk, utána diklór-metánnal extraháljuk, és (a 3. példában leírtak szerint) tisztítás után 324 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert kapunk; $[\alpha]_D^{25} = +6,42^\circ$ ($c = 0,88$; etanol). Az $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ európium shift-reagens jelenlétében (az 1. példa szerint) protonmágneses rezonanciaspektroszkópiával mért optikai tisztaság 100% a protonmágneses rezonanciaspektroszkópiás mérések kísérleti hibáin belül.

214 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert (a 2. példában leírtak szerint) izopropil-aminnal kondenzálva 146 mg (-)-metoprololt kapunk, amelynek olvadáspontja 44–46 °C, $[\alpha]_D^{25} = -5,00^\circ$ ($c = 1,01$; etanol).

Az optikai tisztaság (a 2. példában leírt módszer szerint) 98%-nak bizonyul. Az anyalúg bepárlásával 9 mg 97,5%-os optikai tisztaságú (-)-metoprololt kapunk.

6. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása. *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347-tel (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre, majd ennek átalakítása (-)-metoprolollá.

200 ml *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 sejtuszpenziót (amelyet a 3. példában leírtak szerint készítettünk) 2 g allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterrel 30 °C-on 5 óra hosszat inkubálunk. Diklór-metánnal végzett extrakció és szilikagélen (az 1. példa szerint) végzett extrakció és szilikagélen (az 1. példa szerint) végzett tisztítás után 289 mg (+)-glicil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert kapunk; $[\alpha]_D^{25} = +8,02^\circ$ ($c = 1,16$; etanol). Az $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ európium shift-reagens jelenlétében (az 1. példa szerint) protonmágneses rezonanciaspektroszkópiával mért optikai tisztaság a protonmágneses rezonanciaspektroszkópiás mérések kísérleti hibáin belül 100%.

171 mg (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-étert (a 2. példában leírtak szerinti módszerrel) izopropil-aminnal reagáltatva 154 mg 44–45 °C olvadáspontú (-)-metoprololt kapunk; $[\alpha]_D^{25} = -5,27^\circ$ ($c = 0,967$; etanol). Az optikai tisztaság az S-leucil-diasztereomer-származékok (2. példa szerinti) nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálata alapján 98,4%. Az anyalúg bepárlásával 6 mg 92,2%-os optikai tisztaságú (-)-metoprololt kapunk.

7. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter mikrobiológiai átalakítása (+)-glicil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre.

50 ml ásványi sós táptalaj, 0,05 ml Tween 80, 0,05 ml tetradekán és 0,05 ml allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter elegyét inkubáljuk vagy *Nocardia corallina* ATCC 31338-cal vagy *Rhodococcus* sp. NCIB 11277-tel vagy *Mycobacterium rhodochrous* NCIB 9703-mal (melyeket előtte 72 óra hosszat 0,5% tetradekánra tenyésztünk), majd 30 °C-on inkubáljuk. Mintákat veszünk 24 óra és 96 óra után, diklór-metánnal extraháljuk, és gázkromatográfiával (GC) analizáljuk.

A glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éternek megfelelő csúcsokat az egyes esetekben meghatározva a következő konverziókat az egyes esetekben meghatározva a következő konverziókat kapjuk: *Mycobacterium rhodochrous* 24 óra múlva 2%; *Rhodococcus* sp. 96 óra múlva 1% és *Nocardia corallina* 96 óra múlva 5%.

A szerkezet további bizonyítását úgy kapjuk, hogy egy *Nocardia corallina* felhasználásával (500 ml tenyészet, körülmények az előbbiektől) végzett pontosan bemért kísérleti tenyészetet diklór-metánnal extrahálunk, majd szilikagélen tisztítjuk, és protonmágneses rezonanciaspektroszkópiával analizáljuk. A glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter európium shift-reagens jelenlétében felvett protonmágneses rezonanciaspektruma 100%-os optikai tisztaságot bizonyít, és azonos a *Rhodococcus* equivel kapott (+)-glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter európium shift-reagenssel felvett protonmágneses rezonanciaspektrumával.

8. példa

Allil-fenil-éter átalakítása *Mycobacterium* NCIB 11626-tal (+)-fenil-glicidil-éterre, majd ennek átalakítása (-)-3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanollá.

Folytonos tenyésztési körülmények: 2,7 literes tenyészet-térfogat; AM2 táptalaj [amely 1,45 g/liter ammónium-szulfátot, 1,0 g/liter foszforsavat, 0,099 g/liter magnézium-szulfát-heptahidrárt, 0,015 g/liter kalcium-klorid-dihidrárt, 2 ml/liter TK3 nyomelem-oldatot, 1 ml/liter 0,1 mólus vas(II)-szulfát-heptahidrárt oldatot tartalmaz]; szénforrás; 25 ml/perc etilén; levegő; 300 ml/perc; keverő sebessége: 280 ford/perc; hőmérséklet: 28 °C; pH = 6,8; hígítási sebesség: 0,02/óra ($\mu_{\text{max}} = \text{kb. } 0,03/\text{óra}$).

Ezek a körülmények körülbelül 3,2 g/liter szárazsúly biomassa szintet biztosítanak. A sejteket felhasználás előtt általában centrifugálással koncentráljuk, majd a megadott közegben reszuszpendáljuk.

A fenil-glicidil-étert gázkromatográfiával analizáljuk (oszlop és körülmények az előbbi példában megadottakkal azonosak, azzal az eltéréssel, hogy a hőmérséklet-program 50 °C – 100 °C-ig 10 °C/perc-nél).

Egy 2,25 literes térfogatú kétfázisú rendszert használunk a fenil-glicidil-éter előállításához. Az átalakítást 750 ml sejtuszpenzióval (6,9 g/liter szárazsúly) és 1500 ml 2,5 térf. = térf.% allil-fenil-étert tartalmazó izooktánnal töltött fermentorban hajtjuk végre (lásd 4. ábra). Az epoxid 193 $\mu\text{mol}/\text{óra}/\text{g}$ száraz súly (0,03 g/óra/g száraz súly) sebességgel termelődik, és 10 óra múlva szilikagélen végzett kromatográfiával különítjük el, majd desztillációval tisztítva 750 mg (+)-fenil-glicidil-étert kapunk.

A mikrobiológiai úton előállított (+)-fenil-glicidil-éter protonmágneses rezonanciaspektruma és tömegspektruma egyezik a megfelelő szerkezettel, és azonos fenil-allil-éter m-klór-perbenzoesavval való reagáltatásával kémiai úton előállított ($\pm$)-fenil-glicidil-éter spektrumával. A (+)-fenil-glicidil-éter fajlagos forgatóképessége:

$[\alpha]_D^{25} = +11,38^\circ$ ($c = 1,09$; etanol).

Az optikai tisztaságot $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ európium shift-reagens jelenlétében az 1. példában leírtakhoz hasonlóan protonmágneses rezonanciaspektroszkópiával vizsgáljuk. A shift-reagens hozzáadására az egyes geminális protonoktól származó jelek burkoló görbéje a kémiailag szintetizált $(\pm)$ -fenil-glicidil-éterben lefelé tolódik, és mindegyik két egyenlő intenzitású jelsávra hasad fel, míg a mikrobiológiailag előállított $(+)$ -fenil-glicidil-éterben lévő geminális protonoktól származó jelek sávja 6,7 : 1 arányban hasad fel. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a molekulák 87%-a van az egyik enantiomer formában, ami 74%-os optikai tisztaságnak felel meg. A mikrobiológiai és kémiai forrásból származó epoxidok keverékének analízise olyan jelerányt ad, ami azt tanúsítja, hogy a $(+)$ -fenil-glicidil-éter 90%-a van az egyik enantiomer formában, ami 80%-os optikai tisztaságot jelent.

A $(+)$ -fenil-glicidil-éter optikai tisztaságának további vizsgálatát $(-)$ -3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanollá való átalakítása után végezzük el.

300 mg $(+)$ -fenil-glicidil-étert (a 2. példában leírtak szerint) izopropil-aminnal reagáltatva 125 mg $(-)$ -3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanolt kapunk, amelynek olvadáspontja $42-44^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -6,51^\circ$ ($c = 0,984$; etanol).

Hasonlóképpen szintetizálunk $(\pm)$ -3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanolt $(\pm)$ -fenil-glicidil-éterből. A $(-)$ -3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanol protonmágneses rezonanciaspektuma és tömegspektuma (5. és 6. ábrák) és a $(\pm)$ -3-fenoxi-1-(izopropil-amino)-2-propanol hasonló spektrumai (itt nem ábrázoljuk) egyeznek a megfelelő szerkezettel. Optikai tisztaságot a megfelelő S-leucil-diasztereomer származékok nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiájával mérünk (mint a 2. példában) és 80%-nak határozzuk meg.

9. példa

(4-Allil-oxi-fenil)-acetamid átalakítása Pseudomonas oleovorans ATCC 29347-tel $(+)$ -[4-(2,3-epoxi/propoxi)-fenil]-acetamiddá, majd ennek átalakítása $(-)$ -3-(izopropil-amino)-1-[4-(karbamoil-metil)-fenoxi]-2-propanollá, $(-)$ -Atenolollá.

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 szuszpenziót készítünk (0,75% nátrium-laktátot és 0,05% dietoxi-metánt tartalmazó PSX ásványi sós táptalajon, pH 7-en, 30°C -on 24 óra hosszat tenyésztett) sejtek 7,5 pH-jú PSX táptalajban az eredeti sejtenyészetet fertogata egytizedének megfelelő fertogatásra való reszuszpendálásával. A PSX táptalaj 8,92 g/liter kálium-dihidrogén-foszfátot, 294 g/liter dinátrium-hidrogén-foszfátot, 0,2 g/liter ammónium-szulfátot, 0,2 g/liter kálium-kloridot, 0,294 g/liter trinátrium-citrátot, 0,005 g/liter kalcium-szulfát-dihidrátot, 0,2 g/liter magnézium-szulfát-heptahidrátot és 10 ml/liter PS II nyomelem oldatot tartalmaz. A PS II nyomelem oldat összetétele: 0,25 g/liter vas(II)-diammónium-szulfát-hexahidrát, 0,05 g/liter cink-szulfát-heptahidrát, 0,03 g/liter mangán(II)-klorid-tetrahidrát, 0,015 g/liter réz(II)-szulfát-pentahidrát, 0,015 g/liter kobalt(II)-klorid-hexahidrát, 0,005 g/liter bórsav, 0,0055 g/liter nátrium-molibdenát-dihidrát, 0,01 g/liter kálium-jodid, sósavval pH 3,0-ra állítva.

Egy 2,5 literes Erlenmeyer-lombikba 1100 ml sejtszuszpenziót rázóasztalon 30°C -on 3,3 g 4-(allil-oxi-fenil)-acetamiddal inkubálunk, amelyet 5% Tween-80-at tartalmazó vízzel golyósmalomban készített 10%-os szuszpenzióként adunk a sejtszuszpenzióhoz. Az inkubált elegyet 72 óra múlva 1000 ml diklór-metánnal extraháljuk, az oldatot megszáritjuk, majd bepároljuk. Utána a maradékot acetontól átkristályosítva 2,27 g fehér kristályos anyagot kapunk, amelynek összetétele 90% (4-allil-oxi-fenil)-acetamid és 10% [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamid a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározás szerint. [Osztóp: Lichrosorb RP8 ($10\ \mu\text{m}$), 25 cm x 1/4 (6,35 mm) külső átm., 4,9 mm belső átm., mozgó fázis 40% acetonitril vízben, 2 ml/perc, UV detektálás].

A körülbelül 230 mg [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamidot tartalmazó kristályosított extraktumot 40 ml vízmentes etanolban oldjuk, utána 2,5 ml izopropil-aminnal visszafolyó hűtő alatt 5 óra hosszat forraljuk, majd a felesleges oldószert eldesztilláljuk. A maradékot 50 ml diklór-metánban oldjuk, és 3 x 50 ml 0,2 n sósavoldattal extraháljuk. A savas fázisokat egyesítjük, diklór-metánnal mosuk, majd utána 5 n nátrium-hidroxid oldattal megilágosítjuk. A keletkező fehér csapadékot 3 x 100 ml diklór-metánnal extraháljuk, az extraktumot nátrium-szulfáton szárítjuk, majd az oldószert ledesztilláljuk. A kapott fehér szilárd anyag hexán/etil-acetát elegyből végzett átkristályosításával 76 mg $(-)$ -Atenololt kapunk, amelynek olvadáspontja $146-148^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -3,9^\circ$ ($c = 1,01$; etanol).

A protonmágneses rezonanciaspektrum (CHCl_3 , 360 MHz) adatai: δ 1,1 (d, 6H, CH_3); δ 1,5-2,5 sáv (s, 2H, NH, OH); δ 2,82 (m, 1H, NHCH); δ 2,75/2,95 (m, 2H, CH_2NH); δ 3,53 (s, 2H, CO-CH_2); δ 3,98 (m, 3H, $-\text{O-CH}_2-\text{CH}-$); δ 5,35 sáv (s, 2H, NH_2); δ 6,9 (d, 2H, para-szubsztituált aromás); δ 7,2 (d, 2H, para-szubsztituált aromás).

A kémiai ionizációs (NH_3) tömegspektrum egy m/e 267 ($\text{M} + \text{H}$)⁺ molekuláris iont adott, 266 molekulásúlyt jelezve, ami egyezik a feltételezett tömeggel. A protonmágneses rezonanciaspektrum és a tömegspektrum azonos a kémiailag előállított $(\pm)$ -Atenolol hasonló adataival.

A $(-)$ -Atenolol optikai tisztaságát dibenzoil-borkósav-monoészter diasztereomer-származékainak fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás oszlopon [Lichrosorb RP8 $10\ \mu\text{m}$), 25 cm x 1/4 (6,35 mm) külső átmérő, 4,9 mm belső átmérő, mozgó fázis 2% ecetsav (pH 3,7-ra ammóniával) 50:50 metanol, 1,5 ml/perc] való elválasztásával határozzuk meg. A származék készítését $(\pm)$ - vagy $(-)$ -Atenolol (R,R)-0,0-dibenzoil-borkósavanhidriddel a W.Linder és munkatársai által a J.Chrom. 316, 605-616 (1984)-ben leírtak szerint való reagáltatásával végezzük. A $(\pm)$ -Atenololból készített származék analízise két közel egyenlő intenzitású diasztereomer csúcsot mutat, míg a $(-)$ -Atenololból készített származék esetében a két csúcs intenzitásának aránya 1,5 : 98,5, ami 97,0%-os optikai tisztaságának felel meg.

10. példa

(4-Allil-oxi-fenil)-acetamid átalakítása Pseudo-

monas oleovorans ATCC 29347-tel [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamiddá.

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 szuszpenziót készítünk (0,75% glicerint és 0,05% dietoxi-metánt tartalmazó PSX ásványi sós táptalajban 7 pH-nál 30 °C-on 24 óra hosszat tenyésztett) sejtek 7,5 pH-nál az eredeti sejtenyészet térfogata egytizedének megfelelő térfogatú PSX táptalajban való reszuszpendálásával.

10 ml (12,6 g/liter szárazsúly) sejtsuszpenziót egy 250 ml-es ledugaszolt Erlenmeyer-lombikban vízmentes körkörös rázógépen 30 °C-on inkubálunk 0,5 ml 90 mg/ml töménységű golyósmalomban őrölt és ultrahanggal homogenizált (4-allil-oxi-fenil)-acetamid szuszpenzióval, amely még 50 mg/ml Tween 80-at is tartalmaz. 1 ml-es mintákat 2 ml diklór-metánnal extrahálunk, az oldószert eldesztilláljuk, majd a maradékot a [9. példában a [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamid analízisére leírt körülmények között végzett] nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás analízis előtt dimetil-formamidban oldjuk. Az inkubációs elegybe a [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamid szintje 0,9 g/liter, illetve 1,3 g/liter 3 óra, illetve 24 óra inkubálás után.

11. példa

(4-Allil-oxi-fenil)-acetamid átalakítása Pseudomonas aeruginosa NCIB 12036-tal, Pseudomonas aeruginosa NCIB 8704-gyel és Pseudomonas putida NCIB 9571-gyel [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamiddá.

Pseudomonas aeruginosa NCIB 12036, Pseudomonas aeruginosa NCIB 8704 és Pseudomonas putida NCIB 9571 sejtsuszpenziókat készítünk (0,75% nátrium-laktátot és 0,05% dietoxi-metánt tartalmazó PSX ásványi savas táptalajon, 7 pH-n, 30 °C-on 24 óra hosszat tenyésztett) sejteknek az eredeti sejtenyészet térfogata egytizedének megfelelő térfogatú 7,5 pH-jú PSX-táptalajban való reszuszpendálásával.

10 ml sejtsuszpenziót vízszintes körkörös rázógépen 250 ml-es ledugaszolt Erlenmeyer-lombikban 0,5 ml 10%-os töménységű golyósmalomban őrölt (2-allil-oxi-fenil)-acetamid szuszpenzióval (amely még 5% Tween 80-at is tartalmaz) 30 °C-on inkubálunk. Az inkubációs elegyeket 24 óra múlva diklór-metánnal extraháljuk. Az inkubációs elegyeket 24 óra múlva diklór-metánnal extraháljuk, és a következő [4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil]-acetamid koncentrációkat találjuk: Pseudomonas aeruginosa NCIB 12036-nél 0,07 g/liter; Pseudomonas aeruginosa NCIB 8704-nél 0,08 g/liter; Pseudomonas putida NCIB 9571-nél 0,19 g/liter (analízis nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával, mint az előbbi példákban).

12. példa

Allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter átalakítása glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterre Pseudomonas oleovorans ATCC 29347-tel.

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 szuszpenziót készítünk (0,075% glicerint és 0,05% dietoxi-metánt tartalmazó 7 pH-jú PSX ásványi sós táptalajon 30 °C-on állandó fázisig tenyésztett) sejteknek az eredeti sejtenyészet térfogata egytizedé-

nek megfelelő térfogatú 7,5 pH-jú PSX táptalajban való reszuszpendálásával.

Egy 250 ml-es Erlenmeyer lombikban 10 ml (12,6 g/liter szárazsúlyú) sejtsuszpenziót inkubálunk vízszintes körkörös rázógépen 37 °C-on 250 µl allil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éterrel és 50 ml glükózzal. A glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter képződését diklór-metánnal végzett extrakció után gázkromatográfiával követjük nyomon (az előbbi példákban leírt körülmények között). Az inkubációs elegyben a glicidil-[4-(2-metoxi-etil)-fenil]-éter koncentrációja hat óra múlva 7,30 g/liter.

13. példa

4-(2-Ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-allil-éter átalakítása Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 törzssel (+)-4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-glicidil-éterre

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 0,5 g/l dietoxi-metánt tartalmazó, 100 ml PSX ásványi sós közegben (pH = 7,0) 7,5 g/l glicerinen 30 °C-on tenyésztett 24 órás biomasszáját 10 ml PSX közeget (pH = 7,5), 5 g/l glükózt és 25 g/l 4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-allil-étert tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba töltjük. A lombik tartalmát 30 °C-on körkörös rázógépen inkubáljuk, és mintákat veszünk, amelyeket diklór-metánnal való extrahálás után Varian 3400 gázkromatográfiaon analizálunk (oszlop: 3% OV1 WHP 100-120-on; 50 cm hossz; 2 mm átmérő; 100-tól 170 °C-ig 10 °C/perc; N₂ 30 ml/perc).

PSX közeg: 8,92 g/l kálium-dihidrogén-foszfát, 2,94 g/l nátrium-hidrogén-foszfát, 1,0 g/l diammonium-hidrogén-foszfát, 0,2 g/l ammónium-szulfát, 1,0 g/l diammonium-hidrogén-foszfát, 0,2 g/l ammónium-szulfát, 0,2 g/l kálium-klorid, 0,294 g/l trinátrium-citrát, 0,005 g/l kalcium-szulfát-dihidrát, 0,2 g/l magnézium-szulfát-heptahidrát és 10 ml/l PS II nyomelem oldat (PS II nyomelem oldat összetétele: 0,25 g/l ammónium-szulfát-vas-szulfát-hexahidrát, 0,05 g/l cink-szulfát-heptahidrát, 0,03 g/l mangán-klorid-tetrahidrát, 0,015 g/l réz-szulfát-pentahidrát, 0,015 g/l kobalt-klorid-hexahidrát, 0,005 g/l bórsav, 0,0055 g/l bórsav, 0,0055 g/l nátrium-molibdenát-dihidrát, 0,01 g/l kálium-jodid és 3 pH-ig sósav).

A (+)-4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-glicidil-éter termék három órás inkubálás után jelenik meg, és 24 óra alatt 3,03 g/l koncentrációra dúsul.

Megfelelő mennyiségű (+)-4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-glicidil-éter feldúsítására az előbb leírt körülmények között hat óra hosszat, de 37 °C-on inkubált 10X10 ml-es tenyészeteket 500 ml diklór-metánnal extraháljuk. A kivonatot nátrium-szulfáton szárítjuk, az oldószert elpárologtatjuk, és az epoxidot kovasavgélen hexán és éter elegyével gradiens eluálással (az epoxid 45-60% éterrel eluálható) tisztítva 188 mg (+)-4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-glicidil-étert kapunk. $[\alpha]_D^{25} = +1,8^\circ$ (c = 1,0, kloroformban).

A termék PMR spektruma megfelel a kívánt szerkezetnek, és azonos a kémiai szintézissel előállított 4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-glicidil-éter spektrumával.

A termék optikai tisztaságát enantiomerjeinek

királis HPLC oszlopon (Daicel chiralcel OD; 25 cm x 4,6 mm; mozgó fázis: hexán, 2-propanol és dietil-amin 800:200:1; 0,6 ml/perc, UV-detektálás 254 nm) végzett vizsgálatával igazoljuk.

A kémiai szintézissel előállított 4-(2-ciklopropil-metoxi-etil)-fenil-glicidil-éter elemzése két, körülbelül egyenlő intenzitású csúcsot mutat a racemát-nak megfelelően. A *Pseudomonas oleovorans* alkalmazásával előállított minta csak egy kimutatható csúcsot mutat, amely a kémiai szintézissel készített minta egyik csúcsának felel meg.

14. példa

(4-Metoxi-fenil)-allil-éter átalakítása (+)-(4-metoxi-fenil)-glicidil-éterre *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 törzsszel

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 0,5 g/l dietoxi-metánt tartalmazó, 100 ml PSX ásványi sós közegben (pH = 7,0) 7,5 g/l glicerinen 30 °C-on tenyésztett 24 órás biomasszáját 10 ml PSX közeget (pH = 7,5), 5 g/l etanolt és 25 g/l (4-metoxi-fenil)-allil-étert tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba töltjük. A lombik tartalmát 37 °C-on körkörös rázógépen inkubáljuk, és mintákat veszünk, amelyeket diklór-metánnal extrahálunk a 13. példában ismertetett módon végzett gázkromatografálás előtt.

A (+)-(4-metoxi-fenil)-glicidil-éter termék egy órás inkubálás után jelenik meg, és 4 óra alatt 0,57 g/l koncentrációra dúsul.

Megfelelő mennyiségű (+)-(4-metoxi-fenil)-glicidil-éter feldúsítására az előbb leírt körülmények között három óra hosszat, de 2 literes lombikokban inkubált 6x87 ml-es tenyészeteket 780 ml diklór-metánnal extraháljuk. A kivonatot nátrium-szulfáton szárítjuk, az oldószert elpárologtatjuk, és az epoxidot kovasavgélen hexán és éter elegyével tisztítva 190 mg (+)-(4-metoxi-fenil)-glicidil-étert kapunk. $[\alpha]_D^{25} = +4,1^\circ$ (c = 1,0, kloroformban).

A termék tömeg- és PMR spektruma megfelel a kívánt szerkezetnek, és azonos a kémiai szintézissel előállított (4-metoxi-fenil)-glicidil-éter spektrumával.

A termék optikai tisztaságát enantiomerjeinek királis HPLC oszlopon a 13. példában leírt módon való szétválasztásával határoztuk meg, de mozgó fázisként hexán, 2-propanol és dietil-amin 900:100:1 arányú elegyét használtuk.

A kémiai szintézissel előállított (4-metoxi-fenil)-glicidil-éter elemzése két, körülbelül egyenlő intenzitású csúcsot mutat a racemát-nak megfelelően. A *Pseudomonas oleovorans* alkalmazásával előállított minta csak egy kimutatható csúcsot adott, amely a kémiai szintézissel készített minta egyik csúcsának felel meg.

15. példa

para-Szubsztituált fenil-allil-éterek átalakítása *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 törzsszel megfelelő, optikailag aktív para-szubsztituált fenil-glicidil-éterekké

Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 0,5 g/l dietoxi-metánt tartalmazó, 100 ml PSX ásványi sós közegben (pH = 7,0) 7,5 g/l glicerinen 30 °C-on tenyésztett 24 órás biomasszáját 10 ml PSX közeget

(pH = 7,5), 5 g/l mennyiségét tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba töltjük. (Etoxi-fenil)-allil-éter és (fenil-fenil)-allil-éter esetében a prekursor vízzel készült, 5% Tween 80-at tartalmazó, golyósmalomban örölt, 10%-os szuszpenzióként alkalmazzuk. A lombikokat 37 °C-on körkörös rázógépen inkubáljuk, és mintákat veszünk, amelyeket diklór-metánnal extrahálunk a 13. példában ismertetett módon végzett gázkromatografálás előtt.

Az aril-glicidil-éter termékek három órás inkubálás után jelennek meg, és öt óra alatt az alábbi koncentrációkra dúsulnak:

Vegyület	Koncentráció (g/l)
I (4-klór-fenil)-glicidil-éter	1,91
II (4-etoxi-fenil)-glicidil-éter	0,15
III (4-fluor-fenil)-glicidil-éter	0,26
IV [4/(metil-tio)-fenil]-glicidil-éter	1,52
V (4-nitro-fenil)-glicidil-éter	3,02
VI (4-fenoxi-fenil)-glicidil-éter	0,22
VII (4-fenil-fenil)-glicidil-éter	0,43

A termékek optikai tisztaságát enantiomerjeiknek királis HPLC oszlopon a 13. példában (II-VI vegyületek), illetve a 14. példában (I, III és VII vegyületek) leírt módon való szétválasztásával határoztuk meg.

A kémiai szintézissel előállított aril-glicidil-éterek elemzése két, körülbelül egyenlő intenzitású csúcsot mutat a racemát-nak megfelelően. A *Pseudomonas oleovorans* alkalmazásával előállított minta csak egy kimutatható csúcsot adott, amely a kémiai szintézissel készített minta egyik csúcsának felel meg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az (I) általános képletű 3-szubsztituált 1-(alkil-amino)-2-propanolok - a képletben

R₁ jelentése fenilcsoport vagy karbamoil-(1-4 szénatomos)-alkil- vagy (1-4 szénatomos)-alkoxi-(1-4 szénatomos)alkilcsoporttal szubsztituált fenilcsoport,

R₂ jelentése 2-6 szénatomos alkilcsoport - vagy gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sóik sztereospecifikus formában való előállítására, azzal jellemezve, hogy egy (III) általános képletű vegyületet - a képletben

R₁ jelentése az (I) általános képletnél megadottakkal azonos -

Nocardia corallina, *Rhodococcus* sp. (NCIB 11277), *Mycobacterium rhodochrous*, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium* WM1 (NCIB 11626) mikroorganizmussal sztereospecifikusan epoxidálunk, és a kapott (II) általános képletű fenil-(2,3-epoxi-1-propil)-étert - R₁ a fenti - 2-6 szénatomos alkil-aminnal reagáltatjuk, és a keletkezett (I) általános képletű vegyületet gyógyszerészetileg elfogadható sójává alakítjuk át. (Elsőbbsege: 1985.02.13.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy 2-6 szénatomos alkil-aminként izopropil-amint vagy terc-butil-amint használunk. (Elsőbbse-

ge: 1985.02.13.)

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

R₁ jelentése fenilcsoport vagy 4-helyzetben karbamoil-(1-4 szénatomos) alkilcsoporttal vagy az alkilrészekben 1-4 szénatomos alkoxi-alkilcsoporttal szubsztituált fenilcsoport,

azzal jellemezve, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

R₁ jelentése 4-(2-metoxi-etil)-fenil-, 4-(karbamoil-metil)-fenil- vagy fenil-csoport,

azzal jellemezve, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

5. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

R₁ jelentése 4-(2-metoxi-etil)-fenilcsoport, azzal jellemezve, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

6. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

R₁ jelentése 4-(karbamoil-metil)-fenilcsoport, azzal jellemezve, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1985.10.16.)

7. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyek képletében

R₁ jelentése fenilcsoport, azzal jellemezve, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1985.10.16.)

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Nocardia corallina*, előnyösen *Nocardia corallina* ATCC 31338 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Rhodococcus* sp. NCIB 11277 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-

amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Mycobacterium rhodochrous*, előnyösen *Mycobacterium rhodochrous* NCIB 9703 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Rhodococcus equi*, előnyösen *Rhodococcus equi* NCIB 12035 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Pseudomonas aeruginosa*, előnyösen *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 12036 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

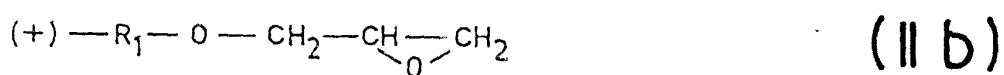
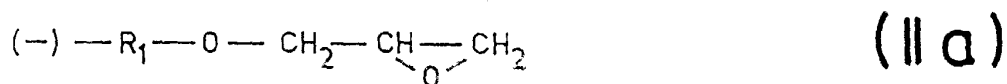
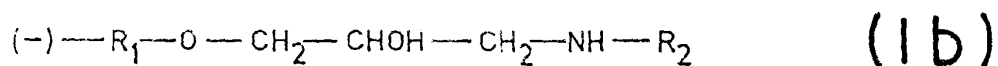
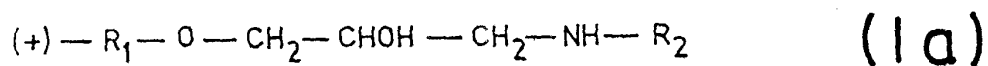
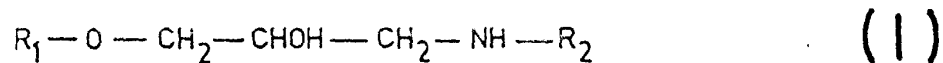
13. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Pseudomonas oleovorans*, előnyösen *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

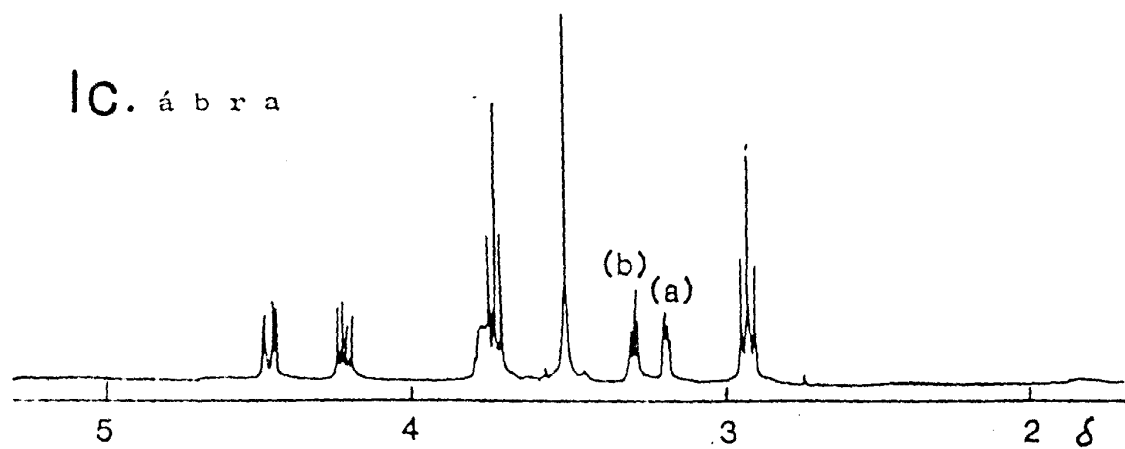
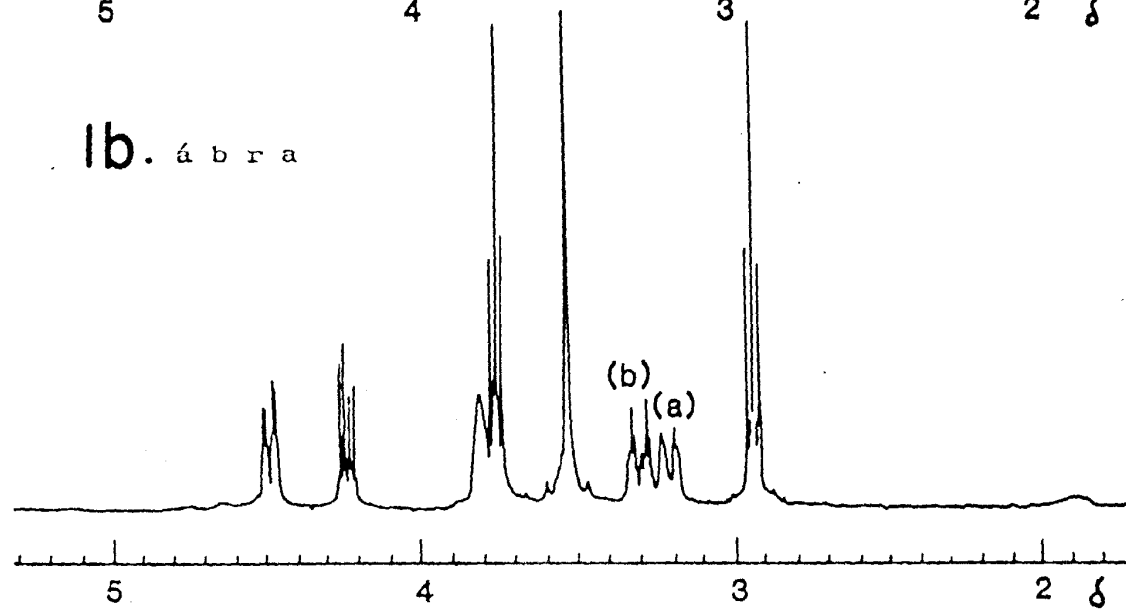
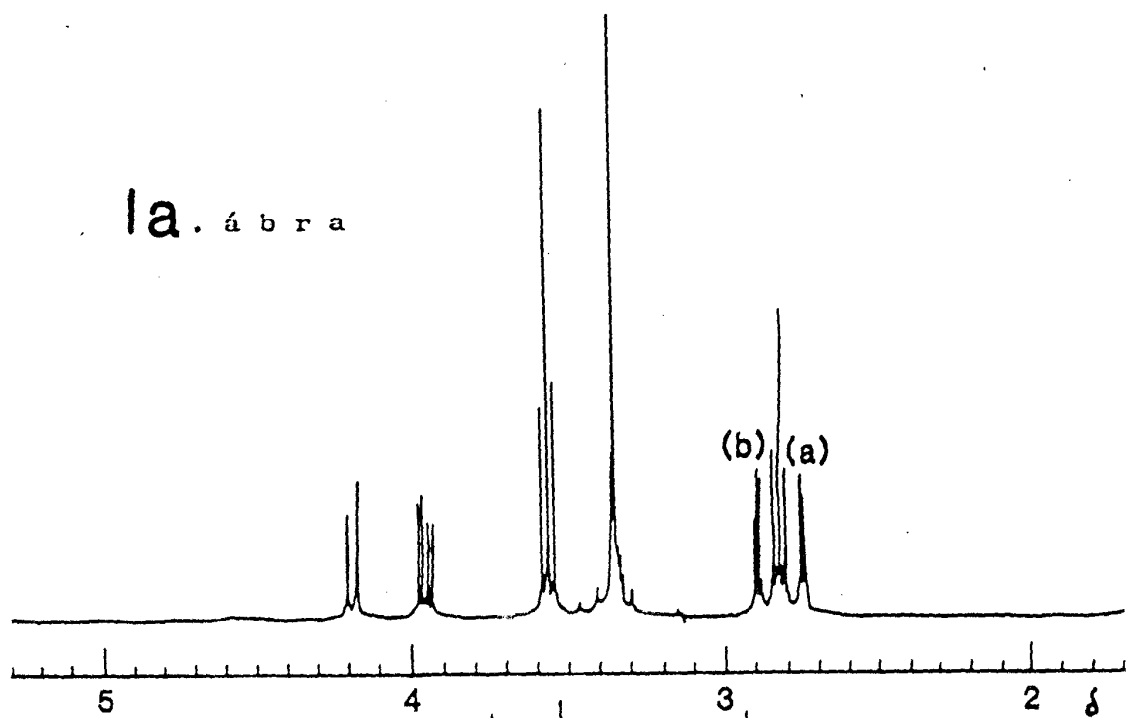
14. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Pseudomonas putida*, előnyösen *Pseudomonas putida* NCIB 9571 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Pseudomonas aeruginosa*, előnyösen *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 8704 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

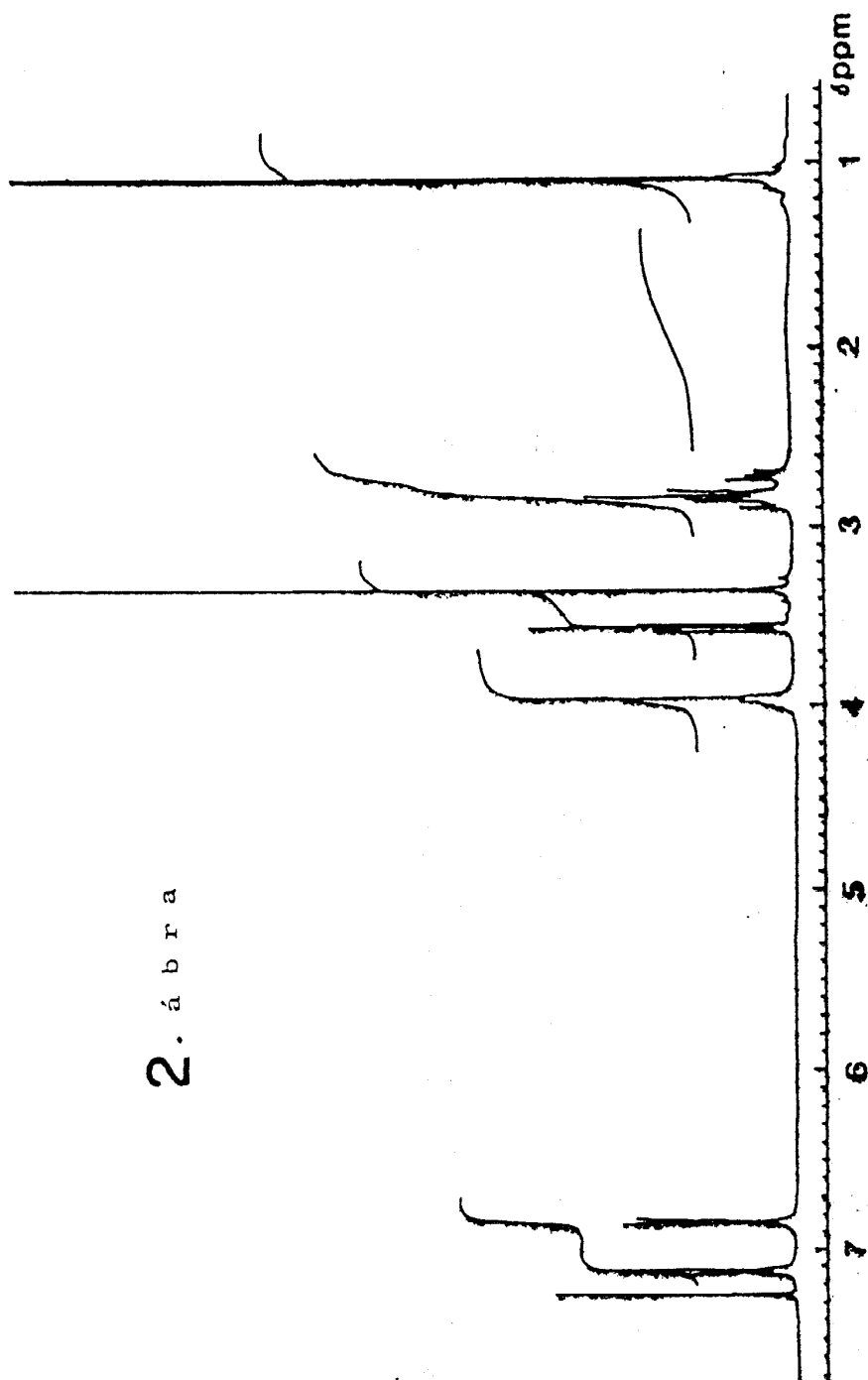
16. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-fenoxi-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Mycobacterium* WM1, NCIB 11626 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.02.13.)

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1-(izopropil-amino)-3-[4-(2-metoxi-etil)-fenoxi]-2-propanol előállítására, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként *Pseudomonas oleovorans*, előnyösen *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1985.10.16.)

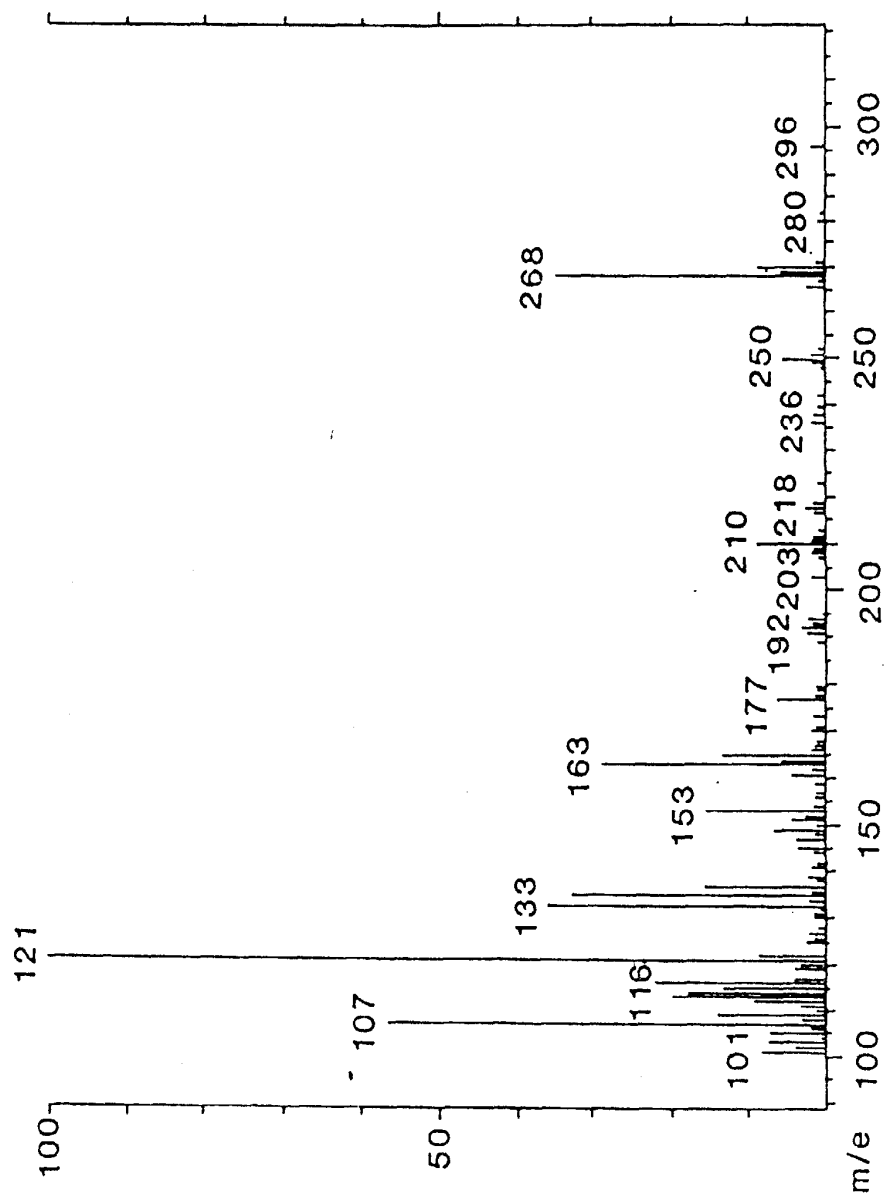




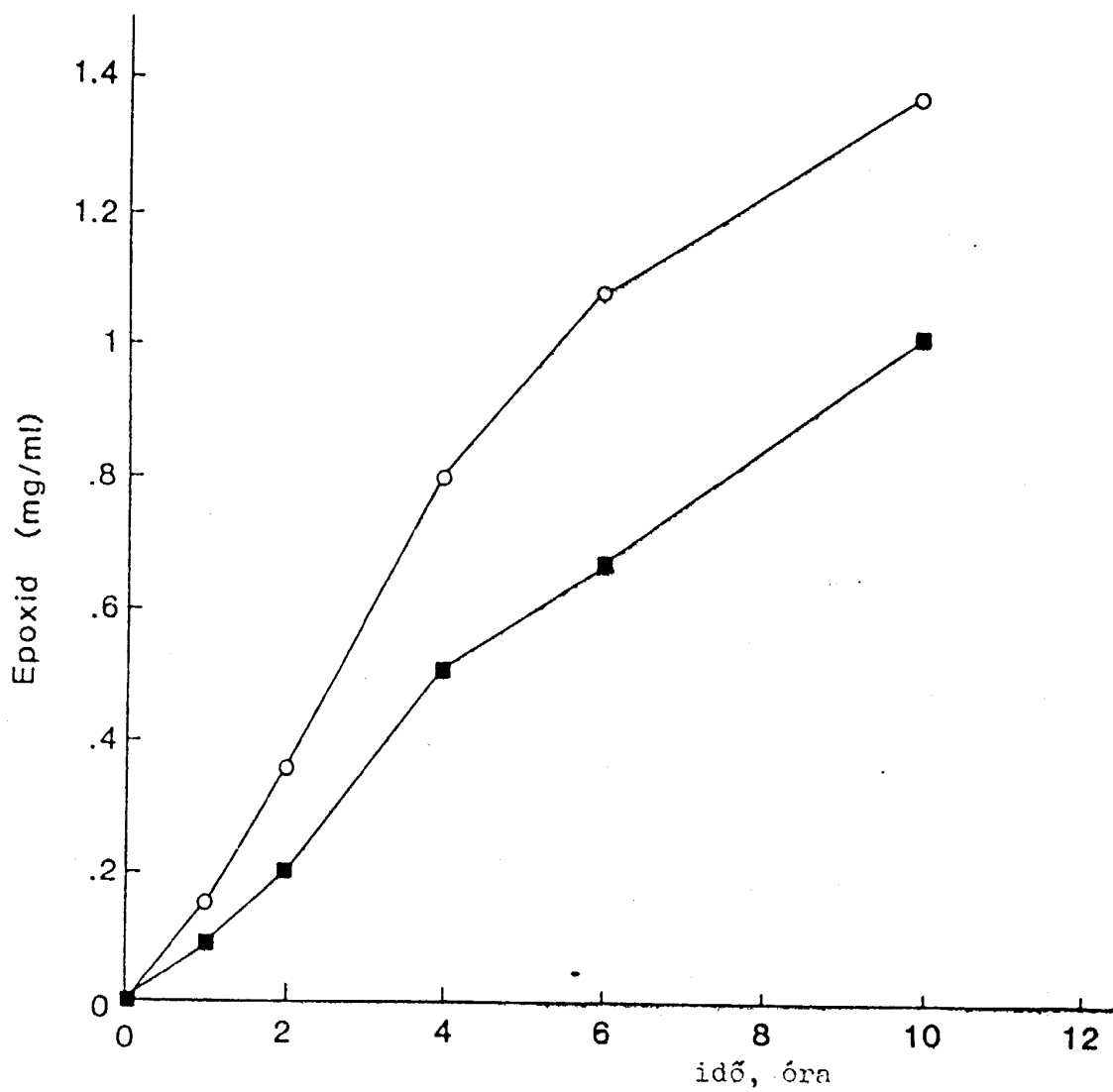
2. á b r a

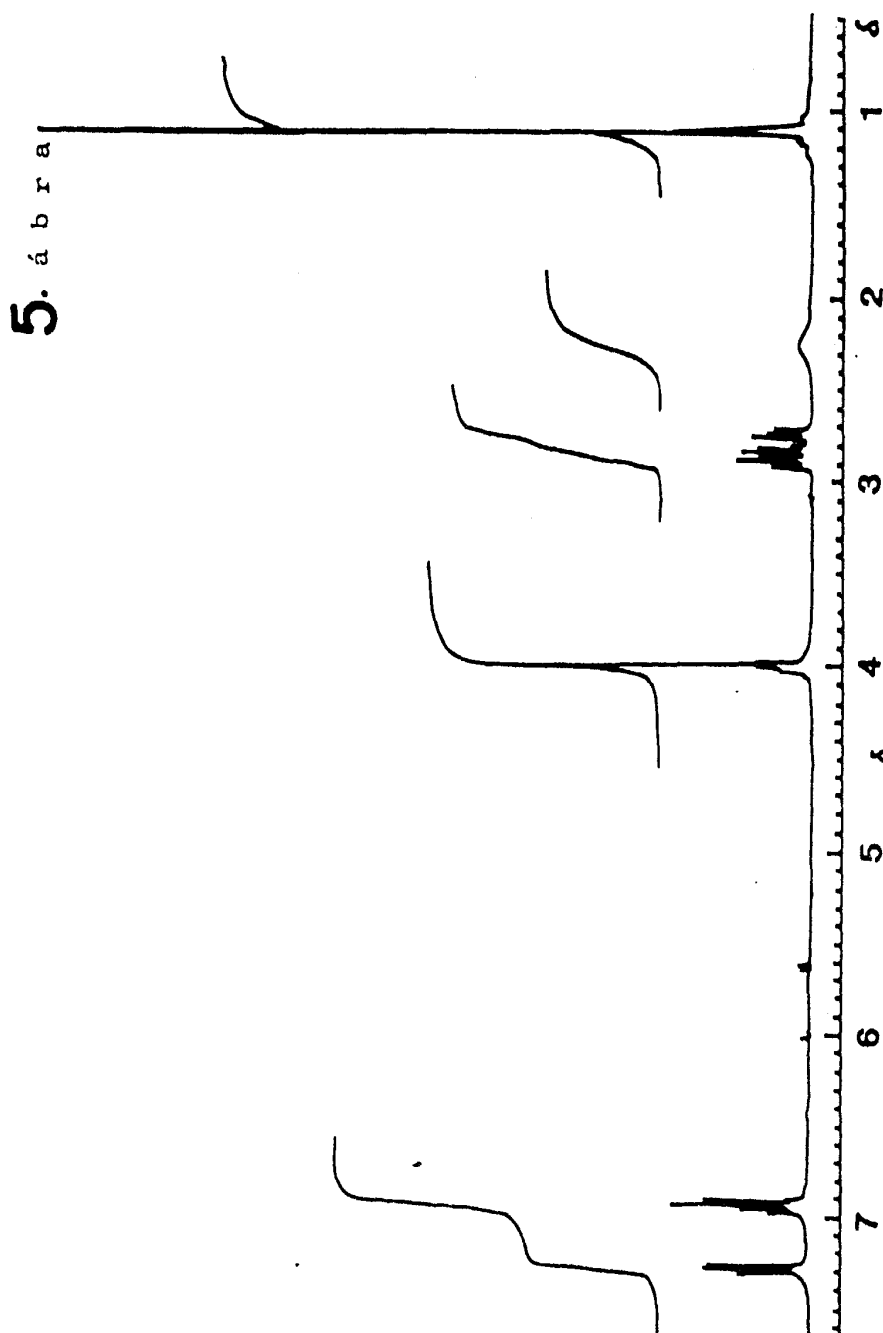


3 . á b r a



4. á b r a





6. á b r a

