



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 78469
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patenttihallitus
 Helsinki, Finland 10 00 1980

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 07 D 211/46, C 12 P 19/26

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

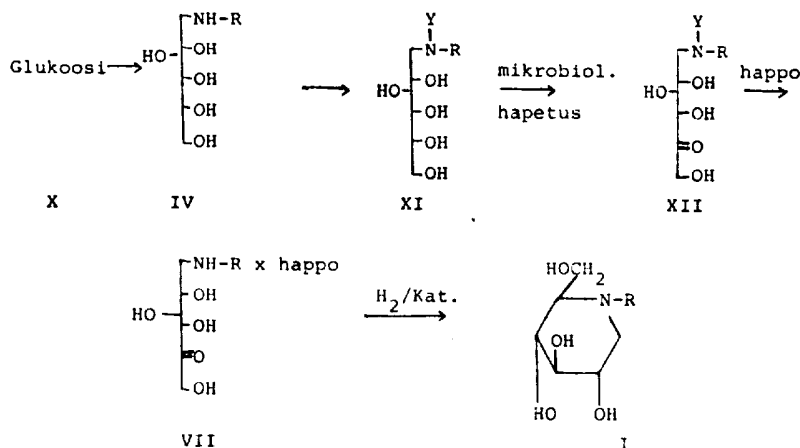
(21) Patentihakemus - Patentansökning 813182
 (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 13.10.81
 (24) Alkuperäisyys - Giltighetsdag 13.10.81
 (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 16.04.82
 (44) Nähtävöksiannottu ja kuul.julkaisun pvm. -
 Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 28.04.89
 (86) Kv. hakemus - Int. ansökan
 (32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet 15.10.80

Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken
 Tyskland(DE) P 3038901.6 Toteennäytetty-Styrkt

- (71) Bayer Aktiengesellschaft, Leverkusen, Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
 (72) Günther Kinast, Wuppertal, Michael Schedel, Wuppertal, Wolfgang Koebernick, Wuppertal, Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
 (74) Oy Kolster Ab
 (54) Menetelmä 1-desoksinojirimysiinin N-substituoitujen johdannaisten valmistamiseksi - Förfarande för framställning av N-substituerade 1-desoxinojirimycinderivat

(57) Tiivistelmä

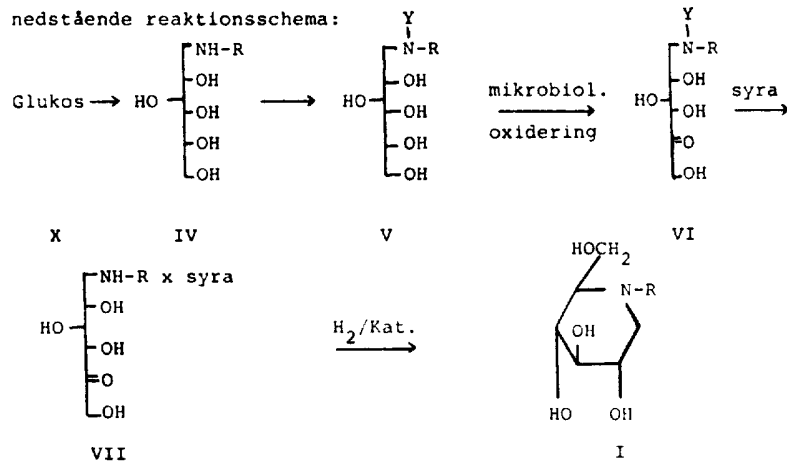
Keksintö koskee uutta menetelmää kaavan I mukaisten 6-aminosorboosien valmistamiseksi seuraavan reaktiokaavion mukaisesti:



Kaavoissa R merkitsee vetyä tai mahdollisesti substituoitua alkyylia tai aralkyylia, ja Y on hapon avulla lohkaistavissa oleva suojaryhmä, joka on pysyvä mikrobiologisesti suoritetussa hapetusreaktiossa.

(57) Sammandrag

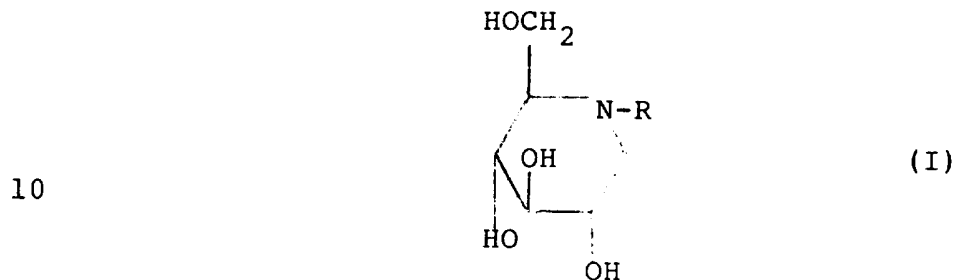
Uppfinningen hänför sig till ett nytt förfarande för framställning av 6-aminosorboser med formeln I i enlighet med nedstående reaktionsschema:



I formeln I betecknar R väte eller en eventuellt substituerad alkyl eller aralkyl, och Y är en med syra avspjälkbar skyddsgrupp, vilken är beständig vid en mikrobiologiskt utförd oxidationsreaktion.

Menetelmä l-desoksinojirimysiinin N-substituoitujen johdannaisten valmistamiseksi

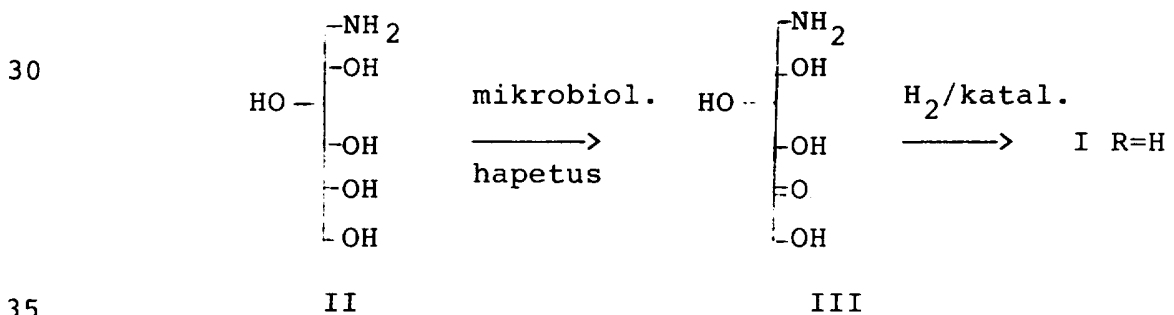
Tämän keksinnön kohteena on uusi menetelmä yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa R on vety tai mahdollisesti hydroksiryhmällä substituoitu alempi alkyyli.

On tunnettua, että kaavan I mukaiset yhdisteet ovat erittäin hyviä α -glukosidaasi-inhibiittoreita, jotka soveltuvat käytettäväksi lääkeaineina sokeritaudin hoidossa (ks. EP-hakemusjulkaisu 947 A 1).

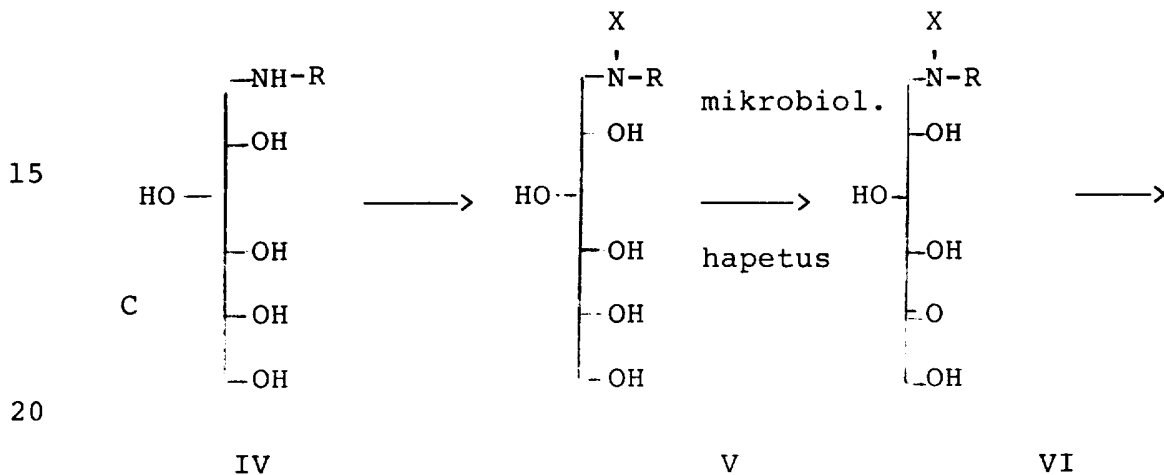
20 DE-hakemusjulkaisusta 2 834 122 tunnetaan menetelmä l-desoksinojirimysiini I:n (R=H) valmistamiseksi hapettamalla kaavan II mukainen l-aminosorbitoli mikrobiologisesti kaavan III mukaisesti 6-aminosorboosiksi, joka sitten hydrataan kaavan I mukaisesti l-desoksinojirimysiiniksi (R=H). Tämä menetelmä ei kuitenkaan saantojensa suhteen, varsinkin koskien seuraavan mikrobiologisen reaktion tilavuussaantoa



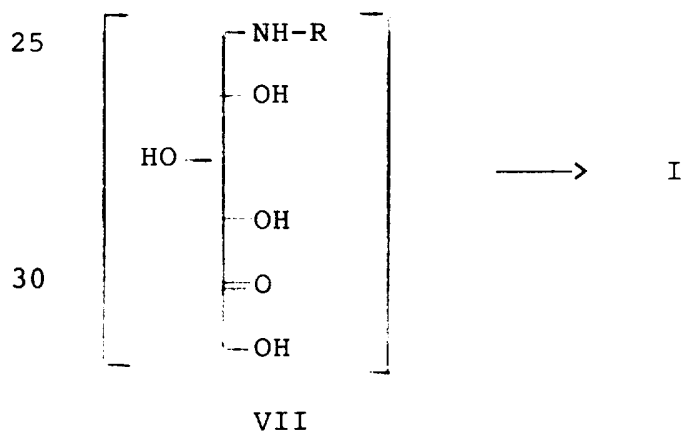
ole vielä optimaalinen.

EP-hakemusjulkaisusta 12 278 A 3 on tunnettua, että kaavan I mukaisia yhdisteitä saadaan suojaamalla kaavan IV mukainen aminosorbitoli hydrolyysillä lohkaistavissa olevalla suojaryhmällä, joka on seuraavassa mikrobiologisessa hapetusmenetelmässä pysyvä, hapettamalla mikrobiologisesti saatu kaavan V mukainen yhdiste suojaetuksi kaavan VI mukaisesti 6-aminosorboosiksi ja tämän jälkeen poistamalla hydrolyysillä suojaryhmä ja suljemalla rengas, jolloin saadaan kaavan I mukainen yhdiste:

10



20

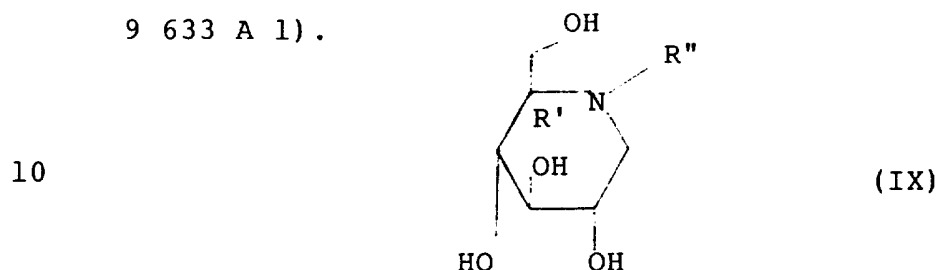


35

Tällöin kuitenkin hydrolyysivaihe vaatii suhteellisen suuria katalysaattorimääriä. Tässä menetelmässä ei väli-

tuotteina syntyneitä kaavan VII mukaisia 6-aminosorbooseja myöskään saada eristetyksi puhtaina yhdisteinä.

Kaavan VII mukaiset yhdisteet ovat tärkeitä α -glukoosi-inhibiittoreita (DE-hakemusjulkaisut 2 830 457 ja 2 830 424) ja välituotteina valmistettaessa kaavan IX mukaisia desoksinojirimysiinejä (EP-hakemusjulkaisu 9 633 A 1).



15 Muita menetelmiä kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi on EP-hakemusjulkaisun 12 278 A 3 kirjallisuusviitteissä sekä EP-hakemusjulkaisussa 947 A1. Niissä kuvatuissa synteesimenetelmissä on kaikissa aikavaiheita, joissa on välttämättä suoritettava hankalia puhdistustoimenpiteitä.

20 Nyt on keksitty, että kaavan I mukaisia yhdisteitä saadaan yksinkertaisella tavalla hyvillä saannoilla menetelmällä, jossa kaavan VII mukaiset 6-aminosorboosivälituotteet voidaan eristää erittäin puhtaina, jolloin suurten katalyysaattorimäärien käyttö ei ole välttämätöntä.

25 Keksinnön kohteena on siten menetelmä kaavan I mukaisten desoksinojirimysiinin ja sen johdannaisten valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että glukoosi muutetaan sinänsä tunnetulla tavalla 1-aminosorbitoliksi (kaava IV), jossa R merkitsee samaa kuin
 30 kaavassa I, aminoryhmä suojataan happamissa olosuhteissa lohkaistavissa olevalla suojaryhmällä, joka on seuraavassa mikrobiologisessa hapetusmenetelmässä pysyvä, saatu kaavan XI mukainen yhdiste hapetetaan mikrobiologisesti sinänsä tunnetulla tavalla suojatuksi 6-aminosorboosiksi (kaava XII),
 35 suojaryhmä poistetaan hapon avulla, saatu kaavan VII mukaisen 6-aminosorboosin suola joko eristetään tai hydrataan kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi tai hydrataan sinänsä tunne-

Hapetuksen suorittamiseen sopivia mikro-organis-
meja tai mikro-organismeja, joista voidaan saada aktii-
visia utteita hapetuksen suorittamiseen voidaan saada eri-
laisista taksonometrisista ryhmistä: niitä ovat esimerkiksi
5 prokaryontit, jotka ovat bakteereja, tai eukaryontit, jotka
ovat sieniä. Mikrobiologian asiantuntija voi helposti löy-
tää sopivia mikro-organismeja viljelemällä suurta joukkoa
aerobisia tai valinnaisesti aerobisia-mikro-organismeja sopi-
vassa ravintoväliaineessa, joka sisältää kaavan XI mukaista
10 yhdistettä, ja kokeilla siten mikro-organismin kykyä kataly-
soida keksinnön mukaista hapetusreaktiota ja kaavan XII mu-
kaisen yhdisteen muodostumista.

Hapetukseen voidaan erityisesti käyttää lahkoon Pseudo-
monales kuuluvia bakteereja, varsinkin Pseudomonadaceae-hei-
15 mon edustajia, joista ennen kaikkea bakteerisukuun Glukono-
bacter kuuluvat bakteerit ovat sopivia. Lisäksi sopiviksi
ovat osoittautuneet corynemuotoiset bakteerit, varsinkin Cory-
nebacterium kuuluvat. Hapetus voidaan lisäksi suorittaa käyt-
tämällä sieniä, esimerkiksi Endomycetales-lahkon sieniä, varsin-
20 kin heimoon Spermophtoraceae kuuluvia ja tällöin pääasiassa
lajin Metschnikowia edustajia käyttäen.

Esimerkkeinä mainittakoon:

Gluconobacteroxidans spp. suboxydans (DSM 50 049), Glucobac-
teroxidans spp. suboxydans (DSM 2003), Corynebacterium betae
25 (DSM 20 141) ja Metschnikowia pulcherima (ATCC 20 515).

DSM-numerot ilmoittavat mikro-organismien tallennusnu-
meron laitoksessa Deutsche Sammlung für Mikro-organismen,
Göttingen. Mietschnikowia pulcherima on tallennettu laitok-
seen American Type Culture Collection, Rockville Maryland,
30 USA.

Kun hapetus suoritetaan kokonaisilla mikro-organismeilla
käyttämällä elävää viljelmää, niin voidaan käyttää kiinteitä,
puolikiinteitä tai nestemäisiä vesipitoisia ravintoväliai-
neita.

35 Viljely voidaan suorittaa kaikissa väliaineissa, jotka
tunnetusti sopivat edellä mainittujen mikro-organismiryhmien
viljelyyn ja jotka sisältävät hapettavaa yhdistettä. Vilje-
lyväliaineen on sisällettävä assimiloituvaa hiilen ja typen
lähdettä sekä mineraalisuoloja. Assimiloituvina hiilen ja

typen lähteinä voidaan käyttää ennen kaikkea kompleksisia seoksia, varsinkin erilaisia biologista alkuperää olevia tuotteita, esimerkiksi soijapapujauhoa, puuvillasiemenjauhoa, linssijauhoa, hernejauhoa, liukoisia ja liukene-
 5 mattomia kasviproteiineja, maissinliotuslientä, hiivauutetta, peptonia ja lihauutetta. Typen lähteinä tulevat lisäksi kysymykseen ammoniumsuolat ja nitraatit, esimerkiksi ammoniumkloridi, ammoniumsulfaatti, natriumnitraatti ja kaliumnitraatti. Viljelyväliaineen sisältämistä mineraali-
 10 suoloista saadaan esimerkiksi seuraavia ioneja:

Mg^{++} , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{--} , PO_4^{---} ja NO_3^- sekä tavallisten hivenaineiden, kuten Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Co ja Ni ioneja.

15 Jos mainittu kompleksinen viljelyväliaine tai käytetty vesi ei sisällä näitä suoloja tai hivenaineita riittävästi, on tarkoituksenmukaista vastaavasti täydentää viljelyväliainetta.

On osoittautunut, että lisäämällä väliaineeseen aineenvaihdon välituotteina esiintyviä yhdisteitä, esimerkiksi aminohappoja tai trikarboksyylihapposyklin yhdisteitä, voidaan reaktioaikaa huomattavasti lyhentää.

Hapettavaa yhdistettä voidaan lisätä joko yksinään tai seoksena hapetettavan yhdisteen kanssa perusväliaineeseen.
 25 Lisänä olevina hapetettavina aineina voi olla perusväliaineeseen. Lisänä olevina hapettavina aineina voi olla esimerkiksi isopropanoli, polyoleja, esimerkiksi sorbitoli tai glyseroli, aldehydejä, esimerkiksi glykolialdehydi, aldooseja, esimerkiksi glukoosi tai glukonihappoja.

30 Kun ravintoliuokseen lisätään yhtä tai useampaa mainittuista yhdisteistä, voidaan hapetettava yhdiste lisätä joko ennen ympäämistä tai minä tahansa ajankohtana aikaisen kasvuvaiheen ja myöhemmän pysyvemmän kasvun saavuttaneen vaiheen välillä. Tällaisessa tapauksessa kyseessä olevaa organismia
 35 esiviljellään käyttäen lisänä viljelyväliaineessa hapetettavia yhdisteitä.

Hapetuksessa sopiva pH-alue on 2-10, edullisesti 4-8. Viljelmä puskuroidaan edullisesti sopivalle alueella esimerkiksi fosfaatti- tai asetaattipuskurilla.

Voidaan myös käyttää, fermentointiteknologiassa tavallista automaattista pH-säätöä, jossa viljelyliuokseen eri kohtiin suihkutetaan steriiliä orgaanista tai epäorgaanista happoa, esimerkiksi rikkihappoa, tai emästä, esimerkiksi natriumhydroksidiliuosta.

Kuten mikrobiologisissa menetelmissä yleensä tulisi välttää viljelyväliaineen vierasinfektiota. Sen välttämiseksi suoritetaan tavalliset toimenpiteet, kuten ravintoväliaineen, viljelyastioiden ja ilmastukseen tarvittavan ilman sterilointi. Viljelyastioiden sterilointiin voidaan käyttää esimerkiksi höyry- tai kuivasterilointia; ilma ja viljelyväliaine voidaan samoin steriloida höyryllä, mutta myös suodattamalla.

Viljelyväliaineen ympärysyys suoritetaan tavanomaisella tavalla, esimerkiksi käyttäen vinoviljelmiä tai pulloviljelmiä. Viljely suoritetaan aerobisissa olosuhteissa tavanomaisin menetelmin, eli esimerkiksi ravistusviljelmänä käyttäen ravistuskolvia, ilman avulla sekoitettuna viljelmänä tai submerssiviljelmänä. Viljely suoritetaan edullisesti aerobisena submerssiviljelynä ilmastoiduissa fermentoreissa, esimerkiksi tavanomaisissa submerssifermentointitankeissa. Viljely voidaan suorittaa jatkuvana tai epäjatkuvana.

On tarkoituksenmukaista varmistua siitä, että mikro-organismit ovat riittävästi kosketuksissa hapen ja ravinteiden kanssa, tämä voidaan saada aikaan tavanomaisin menetelmin, kuten ravistamalla ja sekoittamalla.

Jos viljelyssä esiintyy liiallista vaahdonmuodostusta, voidaan lisätä tavanomaisia kemiallisia vaahdonestoaineita, esimerkiksi nestemäisiä rasvoja ja öljyjä, öljyemulsioita, parafiineja, korkeampia alkoholeja, kuten oktadekanolia, sili-koniöljyjä, polyoksietylenejä tai polyoksipropyleeniyhdisteitä. Vaahdonmuodostusta voidaan vaimentaa tai estää myös tavallisilla mekaanisilla laitteistoilla.

Viljelylämpötila voi olla noin 20-40°C. Viljelyaika voi vaihdella suuresti riippuen esimerkiksi ravintoväliaineen koostumuksesta ja viljelylämpötilasta.

Mikrobiologian asiantuntija voi helposti määrittää kulloinkin sopivimmat optimiolosuhteet.

On osoittautunut, että viljelyliemeen lisättyjen hapetettavien yhdisteiden täydelliseen hapettamiseen tarvitaan niiden lisäyksestä laskien yleensä inkubointiaika 3 tunnista 7 vuorokauteen.

5 Hapetusreaktio voidaan suorittaa myös käyttäen sopivien mikro-organismien konsentroituja solususpensioita. Konsentroidut solususpensiot valmistetaan seuraavasti: Kyseeseen tulevia mikro-organismeja viljellään sopivassa ravintoväliaineessa ja linkoamalla kootut mikro-organismit sus-
10 pendoidaan sitten pienempään tilavuuteen samaa ravintoväliainetta tai suola- tai puskuriliuosta, esimerkiksi fysiologisen ruokasuolaliuoksen, KH_2PO_4 -vesiliuokseen, Na-asetaatin tai maleinaatin vesiliuokseen tai yksinkertaisesti vesijohtoveteen tai tislattuun veteen. Tällaiseen solususpensioon
15 lisätään sitten hapetettavat yhdisteet, ja hapetusreaktio suoritetaan samoissa olosuhteissa kuin edellä kuvattu hapetus kasvamalla viljelmällä.

Tämän menetelmän etuna on korkeamman mikro-organismikonsentraation johdosta hapetukseen tarvittavan reaktioajan
20 lyheneminen muutamaan tuntiin.

Mikro-organismien kasvavien viljelmien tai niistä saatujen konsentroitujen solususpensioiden lisäksi hapetukseen voidaan näistä bakteereista valmistettuja uutteita tai uute-reaktioita. Tällöin tulevat kysymykseen raakauutteet, joita
25 saadaan mikro-organismisolusta tunnetuin hajotusmenetelmin. Hajotusmenetelminä voidaan käyttää ultraäänikäsittelyä, French-painekennon lävitse johtamista, hienontamista kvartsihiekan kanssa, inkubointia hajottavien entsyymien kanssa, autolyysiä tai useampikertaista jäädytys-sulatusmenetelmää.

30 Kun hapetukseen käytetään fraktioimattomia raakauutteita, ovat periaatteessa edullisiksi osoittautuneet samat reaktio-olosuhteet, joita kuvattiin kasvavilla tai eristetyillä mikro-organismisoluilla suoritettun hapetuksen yhteydessä.

35 Jos hapetus suoritetaan osittain puhdistetuilla uutevalmisteilla (entsyymeillä), niin tämänkaltaisten valmisteiden saamiseen voidaan käyttää yleisiä proteiinikemian tunnettuja

menetelmiä, kuten ultrasentrifugointia, saostusreaktioita, ioninvaihto- tai adsorptiokromatografiaa, geelisuodatusta tai elektroforeettisia menetelmiä. Sen selville saamiseksi, mikä näillä mainituilla menetelmillä saaduista useista frak-
5 tioista on sopivin käytettäväksi keksinnön mukaisessa hapetusreaktiossa, sekoitetaan kunkin fraktion näyte hapetettavan yhdisteen kanssa 20-45^oC:ssa pH-arvossa 2-10, ja reaktio-seoksesta tutkitaan ohutkerroskromatografisesti muodostunut reaktiotuote. Suoritettaessa reaktio fraktionoitujen solu-
10 uutteiden avulla voi olla tarpeellista lisätä reaktioseokseen lisäkomponentteja, esimerkiksi fysiologisia tai keinotekoisia elektroniakseptoreja, joista mainittakoon NAD⁺, NADP⁺, metyleenisininen, dikloorifenoli-indofenoli, tetratsoliumsuolat jen. Kun tällaisia lisäreaktiokomponentteja käytetään, niiden
15 lisäysmäärä voi vastata substraattimääriä, so. konsentraatioita, jotka ovat samaa suuruusluokkaa kuin reaktion pannun hapetettavan yhdisteen konsentraatio, tai katalyyttisiä määriä, so. konsentraatioita, jotka ovat selvästi alle hapetettavan yhdisteen valitun konsentraation.

20 Haluttaessa toisessa tapauksessa saada lähes kvantitatiivien hapetustulos reaktiopanokseen on lisättävä vielä sellaista systeemiä, joka jatkuvasti regeneroi katalyyttisinä määrinä seoksessa olevan reaktiokomponentin. Kysymykseen tulee esimerkiksi entsyymi, joka huolehtii hapetuksen kuluessa
25 pelkistyneen elektroniakseptorin uudelleenhapettumisesta hapen tai muun hapetusaineen läsnäollessa.

Muuten hapetuksessa fraktioiduilla solu-uutteilla ovat osoittautuneet edullisiksi samat olosuhteet kuin edellä kuvatuissa kasvavilla mikro-organismiviljelmillä tai niiden kon-
30 sentroiduilla solususpensioilla suoritetuissa hapetusreaktioissa. Varsinkin myös tässä tapauksessa sopiva lämpötila-alue on 20-45^oC ja sopiva pH 2-10. Reaktiotuotteen muodostus saavuttaa kuitenkin maksiminsa lyhyemmässä ajassa. Uutekon-
35 sentraatiosta riippuen inkubointiaika on 2 tunnista 3 vuorokauteen.

Halutun yhdisteen muodostumista ajan funktiona voidaan seurata ohutkerroskromatografisesti.

Kaavan XII mukaiset yhdisteet eristetään sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi EP-hakemusjulkaisussa 12 278 kuvattulla tavalla. Erityisen edullisesti kaavan XII mukainen yhdiste kiteytetään suoraan hapetusväliaineesta, erotetaan ja kiteytetään uudelleen sopivasta liuottimesta, esimerkiksi alkoholista, kuten metanolista.

Suojaryhmien lohkaisemiseksi vastaavat suojaryhmiä sisältävät kaavan mukaiset 6-amino-L-sorboosit sekoitetaan huoneen lämpötilassa väkevään tai laimeaan happoon (esimerkiksi 8-n HCL) ja reaktiota seurataan ohutkerroskromatografialla. Lisäämällä sitten reaktioseokseen veden kanssa sekoitettavaa orgaanista liuotinta (esimerkiksi n-propanolia) saadaan kaavan VII-mukainen 6-amino-L-sorboosi, josta suojaryhmä on poistettu eristettynä hydrokloridina kiteisessä muodossa tai siirappina. Näin saatu kaavan VII mukaisen yhdisteen suola voidaan sinänsä tunnetulla tavalla (katso EP-hakemusjulkaisu 7040) muuttaa hydraamalla kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

Hydraus suoritetaan huoneen lämpötilassa vesiliuoksessa H_2 -ylipaineessa (esimerkiksi 20×10^5 Pa). Katalysaattorina voidaan käyttää jalometallikatalysaattoreita (esimerkiksi 5-%:inen Pt/C), edullisesti käytetään kuitenkin Raney-nikkeliä.

Esimerkit

Esimerkki 1

25 1-tert-butylioksikarbonyyliaminosorbitolin valmistus

1-aminosorbitolin (90 g), tetrahydrofuraanin (500 ml) ja veden (500 ml) seokseen tiputettiin huoneen lämpötilassa 131 g di-tert-butylioksikarbonyylipyrokarbonaattia 500 ml:ssa tetrahydrofuraania. Seosta sekoitetaan yön yli, tetrahydrofuraani haihdutettiin vakuuissa, vesifaasi uutettiin 2 x etyyliasetaatilla, haihdutettiin sitten kuiviin, ja jäännös kiteytettiin isopropanolista. Saanto: 110 g, sp. 86-88°C.

Esimerkki 2

35 1-tert-butylioksikarbonyyliamino-N-metyylisorbitolin valmistus

Valmistus tapahtui analogisesti esimerkin 1 kanssa 1-metyyliaminosorbitolista. Saanto: 95 %, sp. 78-80°C.

Esimerkki 3l-tert-butylioksidikarbonyyliamino-N-(β -hydroksietyyli) sorbitolin valmistus

5 l- β -hydroksietyyliaminosorbitolista. Saanto: 78 %;
sp. 103-104^oC.

Esimerkki 4

10 l-tert-butylioksidikarbonyyliaminosorbitolin hapetus
mikro-organismilla Gluconobacter oxidans ssp. suboxidans
(DSM 50 049)

Reaktio suoritettiin seuraavassa ravintoliuoksessa:

20 g/l hiivauutetta
50 g/l sorbitolia
15 4 g/l KH₂PO₄

Ravintoliuoksen aineosat liuotettiin demineralisoituun veteen, liuoksen pH säädettiin NaOH:lla arvoon 6,5. Ravintoliuosta lisättiin litran erlenmeyereihin kuhunkin 250 ml, ja liuos steriloidtiin autoklaavissa 121^oC:ssa 20 minuuttia.

20 Liuoksen jäähtyttyä siihen lisättiin steriilisti 10 g/l-l-tert-butylioksidikarbonyyliaminosorbitolia ja ympiksi 5 % samassa ravintoliuoksessa ilman l-tert-butylioksidikarbonyyliaminosorbitolia kasvatettua esiviljelmää. Inkubointi suoritettiin 28^oC:ssa ravistuskoneessa kierrosluvulla 280 r/min.

25 Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografialla.

96 tunnin kuluttua 10 g/l oli täysin reagoanut. 6-tert-butylioksidikarbonyyliaminosorbitolin eristämiseksi fermentoitu liemi uutettiin butanolilla, uute haihdutettiin kierto-haihduttimessa, ja jäännös kiteytettiin etyyliasetaatista. Sp. 141-143^oC.

Esimerkki 5

35 l-tert-butylioksidikarbonyyliaminosorbitolin hapetus
mikro-organismilla Metschnikowia pulcherima (ATCC 20 515)

Mikro-organismia Metschnikowia pulcherima (ATCC 20 515) esiviljeltiin vinoviljelmänä väliaineella, joka sisälsi litraa kohti 3 g hiivauutetta, 6 g peptonia, 10 g glukoosia, 8 g NaCl ja 20 g agarua demineralisoidussa vedessä. Tällä esiviljelmällä ympätettiin 250 ml nestemäistä viljelyväliainetta

(1 litran erlenmeyerissä), joka sisälsi litraa kohti 3 g hiivauutetta, 6 g peptonia, 10 g sorbitolia, 8 g NaCl ja 10 g 1-tert-butylioksidikarbonyyliamino-sorbitolia (demineralisoidussa vedessä, ja joka oli steriloitu kuumentamalla 121°C:ssa autoklaavissa 20 minuuttia. Viljelmää inkuboitiin 35°C:ssa ravistuskoneessa kierrosluvulla 200 r/min. 1-tert-butylioksidikarbonyyliamino-sorbitolipitoisuutta viljelyliemessä seurattiin ohutkerroskromatografisesti. 2 vrk kuluttua oli 3 g/l (30 %) reagoanut. Fermentointi lopetettiin tässä vaiheessa.

Esimerkki 6

1-tert-butylioksidikarbonyyliamino-sorbitolin hapetus mikro-organismilla Corynebacterium betae (DSM 20 141)

Mikro-organismia Corynebacterium betae (DSM 20 141) esiviljeltiin vinoviljelmänä väliaineella, joka sisälsi 6 g/l hiivauutetta, 5 g/l sorbitolia, 5 g/l NaCl ja 20 g/l agarua demineralisoidussa vedessä. Hyvin kasvaneella vinoviljelmällä ympätettiin 250 ml nestemäistä viljelyväliainetta (1 litran erlenmeyerissä), joka sisälsi litraa kohti 10 g trypsiinihajotettua kaseini-peptonia, 5 g hiivauutetta, 5 g sorbitolia, 5 g NaCl ja 10 g 1-tert-butylioksidikarbonyyliamino-sorbitolia. Viljelyväliaineen aineosat oli liuotettu demineralisoituun veteen ja liuos steriloitu 20 minuuttia autoklaavissa 121°C:ssa. Viljelmää inkuboitiin 37°C:ssa ravistuskoneessa kierrosluvulla 200 r/min.

1-tert-butylioksidikarbonyyliamino-sorbitolipitoisuus määritettiin ohutkerroskromatografisesti. 2 vrk kuluttua oli 5 g/l (noin 50 %) reagoanut. Fermentointi lopetettiin tässä vaiheessa.

Esimerkki 7

1-tert-butylioksidikarbonyyliamino-N-metyylisorbitolin hapetus mikro-organismilla Glucobacter oxydans ssp. suboxydans (DSM 2003)

Mikro-organismin Glucobacter oxydans ssp. suboxydans (DSM 2003) esiviljely suoritettiin ravintoliuoksessa, joka sisälsi 200 g/l sorbitolia, 40 g/l hiivauutetta, 10 g/l KH_2PO_4 demineralisoidussa vedessä. pH säädettiin arvoon 6,5 NaOH:lla,

250 ml tätä ravintoliuosta (joka oli steriloitu 20 minuuttia 121°C:ssa autoklaavissa) ympätettiin vinoviljelmällä ja inkuboitettiin 28°C:ssa ravistuskoneessa kierrosluvulla 280 r/min. 36 tunnin kuluttua ympätettiin tällä esiviljelmällä fermentorissa oleva 10 litran ravintoliuoserä, joka sisälsi 100 g/l sorbitolia, 20 g/l hiivauutetta, 5 g/l KH_2PO_4 , 1 ml polyolivaahdonestoainetta demineralisoidussa vedessä. Fermentorin sisältö oli steriloitu 30 minuuttia 121°C:ssa. Fermentointiolosuhteet olivat seuraavat:

sekoitus 500 r/min, lämpötila: 30°C, ilmastus: 10 l ilmaa/min, pH pidettiin arvossa 5,8 lisäämällä automaattisesti 5-n NaOH-liuosta.

36 tunnin kuluttua lisättiin steriilisti 500 ml 20-%:ista 70°C:eista l-tertbutyylioksidikarbonyyliamino-N-metyylisorbitoliliuosta. 84 tunnin kuluttua oli saavutettu täydellinen 10 g/l reagoimisaste. Hapetustuotteen eristäminen suoritettiin samoin kuin esimerkissä 4.

Esimerkki 8

l-tert-butyylioksidikarbonyyli-N-(β -hydroksietyyli)-sorbitolin hapetus mikro-organismilla *Glucobacter oxydans* ssp. *supoxydans* (DSM 2003)

Mikro-organismia *Glucobacter oxydans* ssp. *suboxydans* (DSM 2003) viljeltiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla 10 litran fermentorissa. 36 tunnin kuluttua 250 ml viljelmää pantiin steriilisti 1 litran erlenmeyeriin, joka sisälsi 2,5 g steriilisti punnittua l-tert-butyylikarbonyyliamino-N-(β -hydroksietyyli)sorbitolia. Inkubointi suoritettiin 28°C:ssa kierrosluvulla 280 r/min. 72 tunnin kuluttua reaktio oli täydellinen. Hapetustuotteen eristämisen suoritettiin n-butanolilla samoin kuin esimerkissä 4.

Esimerkki 9

6-amino-6-desoksi-L-sorboosihydrokloridi

20 g N-tert-butyylioksidikarbonyyli-6-amino-6-deoksi-L-sorboosia lisättiin sekoittaen ja jäähdyttäen annoksettain veden (6,4 ml) ja väkevän kloorivetyhapon (13,2 ml) seokseen. Seosta sekoitettiin jäähdyttämättä 2 tuntia,

sitten lisättiin 2 tunnin aikana 120 ml n-propanolia. Syntyneitä kidesuspensiota sekoitettiin tunnin ajan 0°C:ssa, sitten kiteet imusuodatettiin, pestiin vähäisellä määrällä n-propanolia ja kuivattiin huoneen lämpötilassa vakuuimissa. Saanto 14,2 g \approx 92 % teoreettisesta; sp. 116-125°C (hajoaa).

Laskettu kaavalle $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$: C 33,30 H 6,54 N 6,53
Saatu: C 33,25 H 6,68 N 6,46

Tuote voidaan kiteyttää myös monohydraattina, sp. 70-75°C (hajoaa). Myös monohydraatin analyysiarvot olivat tyydyttävät.

Esimerkki 10

Desoksinojirimysiinihydrokloridi

100 g (0,47mol) 6-amino-6-desoksi-L-sorboosihydrokloridia liuotettiin 1000 ml:aan vettä, liuokseen lisättiin 15 g Raney-nikkeliä ja seosta hydrattiin huoneen lämpötilassa 3 tuntia H_2 -paineella 20×10^5 Pa. Paineen annettiin laskea normaaliksi, katalysaattori suodatettiin ja saatu liuos haihdutettiin vakuuimissa. Kiinteä jäännös liuotettiin kuumentaan 40 ml:aan vettä ja liuokseen lisättiin sitten hitaasti 50°C:ssa 400 ml etanolia. Saatu kidesuspensio jäädytettiin -5°C:seen, imusuodatettiin ja pestiin vähäisellä määrällä etanolia. Kiteet kuivattiin yön yli 50°C:ssa vakuuimissa. Saanto: 70,5 g \approx 75 %; sp. 208-210°C. Saatu yhdiste oli identtinen (IR, HPLC) autenttisen näytteen kanssa.

Esimerkki 11

6-metyyliamino-6-desoksi-L-sorboosihydrokloridi

Analogisesti esimerkin 9 kanssa poistettiin suojar ryhmä N-tert-butylioksikarbonyyli-6-metyyliamino-6-desoksi-L-sorboosista. Saatiin 5 g siirappimaista hydrokloridia, jota sen pysymättömyyden vuoksi käsiteltiin välittömästi edelleen. Saanto 5 g = 80 % siirappia.

Esimerkki 12

N-metyyli-1-desoksinojirimysiini

5 g 6-metyyliamino-6-desoksi-L-sorboosihydroklori-

dia liuotettiin 50 ml:aan vettä, liuokseen lisättiin 0,5 g 5-%:ista Pt/C-katalysaattoria, ja seosta hydrattiin huoneen lämpötilassa H₂-paineessa 20 x 10⁵ Pa 3 tuntia. Suodatetusta hydrokloridiliuoksesta poistetaan Cl⁻-ionit vahvasti emäksisellä ioninvaihtajalla, liuos haihdutettiin kuiviin ja jäännös kiteytettiin etanoli/vesiseoksesta 10:1. Saatiin 2,3 g kiteistä tuotetta (noin 60 % teoreettisesta); 152-154^oC.

Esimerkki 13

10 6-hydroksietyyliamino-L-sorboosihydrokloridi

Analogisesti esimerkin 9 kanssa saatettiin BOC-suojattu 6-hydroksietyyliamino-L-sorboosi (4 g, 0,01 mol) reagoimaan 8-n kloorivetyhapon kanssa, jolloin saatiin 2,2 g siirappimaista 6-hydroksietyyliamino-L-sorboosihydrokloridia. Tuotetta ei karakterisoitu, vaan sille suoritettiin hydraus välittömästi.

Esimerkki 14

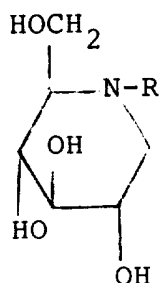
N-hydroksietyyli-1-desoksinojirimysiini

20 2,2 g 6-hydroksietyyliamino-L-sorboosihydrokloridia liuotettiin 30 ml:aan vettä, liuokseen lisättiin 300 mg 5-%:ista Pt/C-katalysaattoria ja seosta hydrattiin huoneen lämpötilassa H₂-paineessa 20 x 10⁵ Pa 3 tuntia. Katalysaattori suodatettiin ja vesipitoisesta suodoksesta poistettiin Cl⁻-ionit vahvasti emäksisellä ioninvaihtajalla. 25 Vesiliuos haihdutettiin kiertohaihduttimessa ja jäännös kiteytettiin etanoli/vesiseoksesta 10:1. Saanto: 1 g $\bar{\sim}$ 55 % teoreettisesta; sp. 144-146^oC.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on kaava I

5

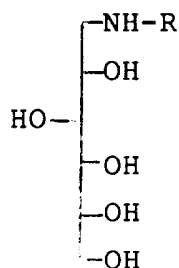


(I)

10

jossa R on vety tai mahdollisesti hydroksiryhmällä substituoitu alempi alkyyli, t u n n e t t u siitä, että glukooosi muutetaan sinänsä tunnetulla tavalla l-aminosorbitoliksi, jolla on kaava

15



(IV)

20

jossa R merkitsee samaa kuin edellä, aminoryhmä suojataan happamissa olosuhteissa lohkaistavissa olevalla suojaryhmällä, joka on seuraavassa mikrobiologisessa hapetusmenetelmässä pysyvä, näin saatu yhdiste hapetetaan mikrobiologisesti sinänsä tunnetulla tavalla suojatuksi 6-aminosorboosiksi, suojaryhmä poistetaan hapon avulla ja näin saatu 6-aminosorboosin suola hydrataan joko eristämisen jälkeen tai yhdessä työvaiheessa sinänsä tunnetulla tavalla kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

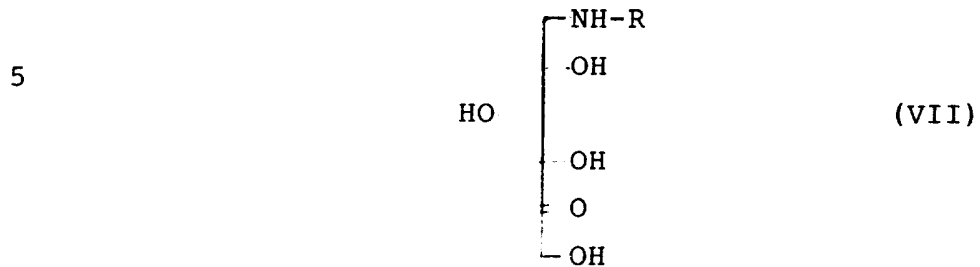
30

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R on vety, metyyli tai hydroksietyyli.

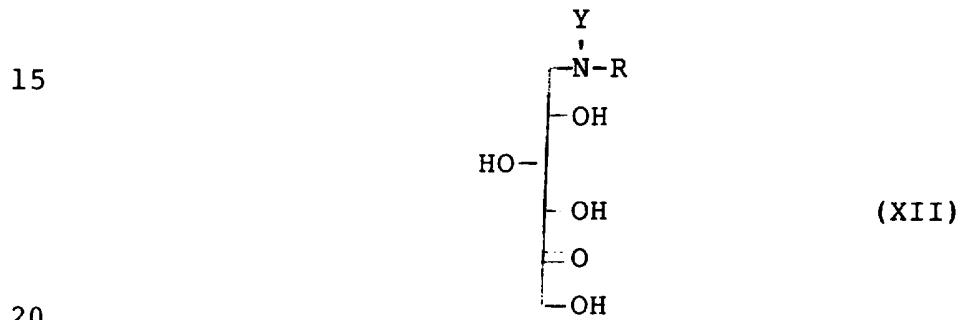
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että suojaryhmä on tert-butoksi-karbonyyli tai o-nitrosulfenyyli.

35

4. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava VII



10 jossa R merkitsee samaa kuin patenttivaatimuksissa 1-3, t u n n e t t u siitä, että yhdistettä, jolla on kaava XII

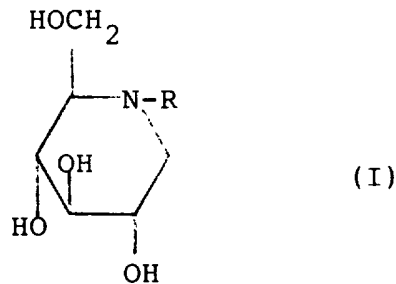


jossa R merkitsee samaa kuin edellä, ja Y on suojaryhmä, käsitellään hapolla, joka sopii suojaryhmän lohkaisemiseen.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av föreningar med formeln I

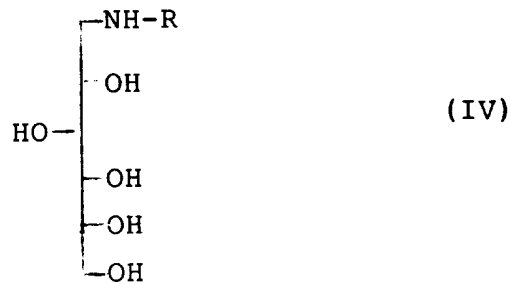
5



10

vari R är väte eller eventuellt med en hydroxigrupp substituerad lägre alkyl, k ä n n e t e c k n a t därav, att man överför glukos på i och för sig känt sätt i l-aminosorbitol med formeln IV

15



20

vari R har ovan angivna betydelse, skyddar aminogruppen med en surt avspjälkbar skyddsgrupp, vilken är beständig i det anslutna mikrobiologiska oxidationsförfarandet, oxiderar den sålunda erhållna föreningen mikrobiologiskt på i och för sig känt sätt till skyddad 6-aminosorbos, avspjälker skyddsgruppen med en syra och hydrerar det sålunda erhållna saltet av 6-aminosorbos antingen efter isolering eller i ett arbetsskede på i och för sig känt sätt till föreningen med formeln I.

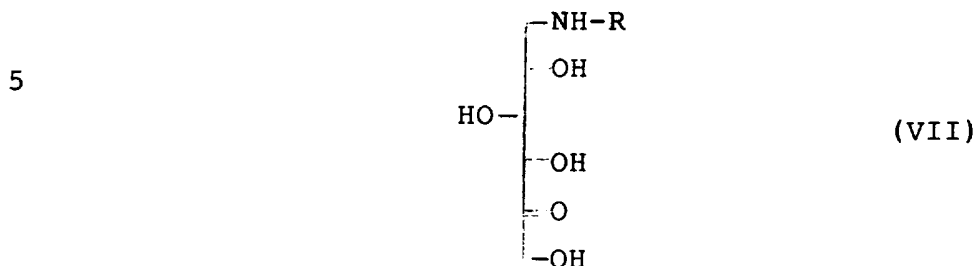
30

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att R är väte, metyl eller hydroxietyl.

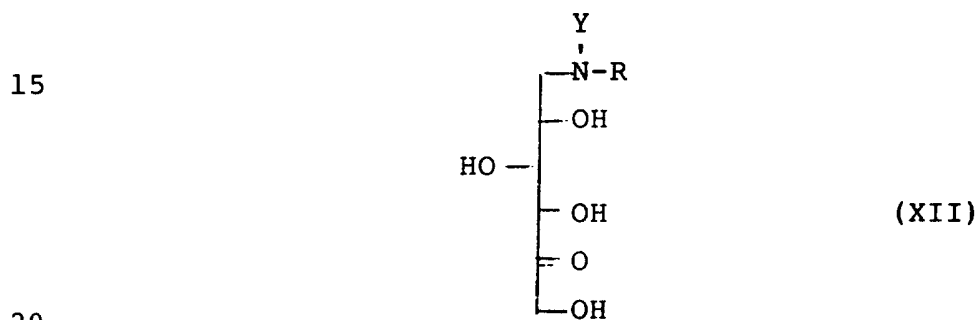
35

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att skyddsgruppen är tert-butyl-oxikarbonyl eller o-nitrosulfenyl.

4. Förfarande för framställning av en förening med den allmänna formeln VII



10 vari R har den i patentkraven 1-3 angivna betydelsen, k ä n n e t e c k n a t därav, att man behandlar en förening med formeln XII



vari R har ovan angivna betydelse och Y betecknar en skyddsgrupp med en syra, vilken lämpar sig för avspjälkande av skyddsgruppen.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: EP 12278 (C 07 D 211/46).