

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 903314 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **903314**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12P 41/00
C12P 17/04
C12N 1/14
C12N 1/20**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **29.06.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **29.06.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **30.12.1990**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

29.06.1989 EP 89201773

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Shell Internationale Research Maatschappij B.V., Carel Van Bylandtlaan 30, 2596 HR Den Haag, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •De Smet, Marie José, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •De Boer, Lex, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä S-2,2-R1,R2-1,3-dioksolaani-4-metanolin valmistamiseksi

Förfarande för framställning av S-2,2-R1,R2-1,3-dioxolan-4-metanol

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

238.90 CBS
8244 CBS

306.89 CBS

307.89 CBS

318.72 CBS

Menetelmä \underline{S} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin valmistamiseksi

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin valmistamiseksi, joka koostuu pääasiassa tai olennaisesti kokonaan \underline{S} -isomeeristä.

\underline{S} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoli on tärkeä lähtöaine maanviljelys- ja farmaseuttisten tuotteiden valmistamiseksi [ks. esim. J. Jurczak et al., Tetrahedron, Vol. 42, n:o 2, s. 447 - 488 (1986)].

Viime vuosina \underline{S} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolista on tullut mielenkiintoinen tärkeänä lähtöyhdisteenä useiden biologisesti aktiivisten tuotteiden valmistamiseksi ja etenkin kiraalisten lääkeaineiden valmistamiseksi. Kiraalisten lähtöaineiden käyttö biologisesti aktiivisten tuotteiden valmistamiseksi optisesti puhtaassa muodossa on edullista, koska se mahdollistaa synteettisten teiden tarkan suunnittelun ja tehokkaan toteutuksen. \underline{S} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoli on eräs tärkeä esimerkki C_3 -syntonista ja sitä käytetään lähtöyhdisteenä useiden muiden C_3 -syntoniinien valmistamiseksi, joita käytetään laajalti kiraalisena rakennuslohkona orgaanisessa synteetissä. Esimerkiksi \underline{S} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia voidaan käyttää muiden kiraalisten syntoniinien, monosakkaridien, niiden johdannaisten ja muiden polyhydroksyylijärjestelmien ja kompleksisemmän rakenteen omaavien biologisesti aktiivisten tuotteiden synteetissä.

Tästä syystä on edelleen olemassa suuri tarve menetelmästä, jota voidaan käyttää teollisuusmittakaavassa ja joka tuottaa taloudellisesti kannattavia saantoja, 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin \underline{S} -stereoisomeerin valmistamiseksi stereoselektiivisesti. Tämä keksintö saa aikaan tällaisen menetelmän. On todettu, että S -isomeerin stereose-



lektiivinen valmistus voidaan suorittaa edullisesti käyttämällä mikro-organismeja tai niistä muodostettuja aineita. Edelleen on todettu, että 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin R-stereoisomeeri voidaan muuntaa edullisesti S-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-karboksyylihapoksi käyttämällä mikro-organismeja tai niistä muodostettuja aineita.

Eurooppalaisessa patenttihakemuksessa EP-A-0244912 on esitetty menetelmä 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin R-isomeerin valmistamiseksi lähtemällä rasemaatista. Tämän eurooppalaisen patenttihakemuksen mukaisesti S-isomeeri hapetetaan sen vastaavaksi hapoksi. (R)-isomeerin hapetuksessa käytetty entsyymijärjestelmä on täysin erilainen kuin (S)-isomeerin hapetuksessa käytetty järjestelmä. Yleensä yhdisteen (R)- ja (S)-enantiomeeri käyttäytyvät kahtena erilaisena substraattina entsyymaattisissa muunnoissa.

Tämä keksintö saa aikaan S-isomeeri-rikkaan 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin valmistamiseksi, jossa R_1 ja R_2 merkitsevät toisistaan riippumatta vetyä tai alkyyli-ryhmää, joka on mahdollisesti substituoitu tai haarautunut, tai jossa R_1 ja R_2 muodostavat yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, karbocyklisen renkaan, joka on mahdollisesti substituoitu, missä menetelmässä R- ja S-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin seos alistetaan mikro-organismin tai siitä muodostetun aineen vaikutukselle, joka pystyy kuluttamaan stereoselektiivisesti R-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia, sellaisen aikajakson ajaksi, että seoksen R-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia kulutetaan S-isomeeri-rikkaan 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin tuottamiseksi. "S-isomeeri-rikas" merkitsee sitä, että läsnä on enemmän kuin raseeminen määrä S-isomeeriä. Sopivasti vähintään 50 paino-% R-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia kulutetaan, jolloin saadaan S-isomeeri-rikas tai olennaisesti puhtaasta S-isomeeristä koostuva

2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoli. "Olennaisesti puhdas" merkitsee sitä, että R-isomeeri on kulutettu sellaisessa määrin, että S-isomeeri on 100%:isesti puhdas koevirheen puitteissa. S-isomeeri-rikas 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoli voidaan ainakin osittain eristää ja/tai käyttää lähtöaineena muiden optisesti aktiivisten yhdisteiden valmistamiseksi. Edullisesti R_1 ja R_2 merkitsevät kumpikin alkyyliryhmää, jossa on vähemmän kuin 6 hiiliatomia, tai ne muodostavat karboksyklisen renkaan, jossa on vähemmän kuin 8 hiiliatomia. Edullisesti R_1 ja R_2 ovat identtisiä. Tällä tavalla yhdisteisiin ei muodostu ylimääräistä asymmetriaa. Etenkin R_1 ja R_2 merkitsevät kumpikin 1 - 3 hiiliatomia sisältävää alkyyliryhmää ja ne muodostavat yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, 5 tai 6 hiiliatomia sisältävän karboksyklisen renkaan.

Kuten edellä esitettiin, 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin R- ja S-isomeerien seos voidaan muuntaa S-isomeeririkkaaksi 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoliksi. Tällä tavalla ainoastaan osa seoksesta voidaan käyttää muissa reaktioissa, esimerkiksi lähdetessä 50 paino-%:n R- ja 50 paino-%:n S-seoksesta ainoastaan puolet 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolista on käytettävissä käyttökelpoisella tavalla. Keksinnön erään suoritusmuodon mukaisesti R-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoli muunnetaan edullisesti S-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-karboksyylihapoksi.

Tällä tavalla ei ainoastaan S-isomeeri-rikkaan 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin valmistus ole mahdollista, vaan samanaikaisesti voidaan saada S-isomeeri-rikas 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-karboksyylihappo. Tällä tavalla voidaan käyttää olennaisesti R- samoin kuin S-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoli. S-isomeeri-rikasta 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-karboksyylihappoa voidaan käyttää lähtöyhdisteenä useiden biologisesti aktiivisten tuotteiden

valmistamiseksi tai se voidaan muuntaa R -isomeeri-rikkaaksi 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanoliksi, joka on samoin tärkeä lähtöyhdiste.

Käsitteellä "mikro-organismit, jotka pystyvät stereoselektiivisen kulutukseen" tarkoitetaan esimerkiksi bakteereita, hiivoja, sieniä. Edullisesti käytetään hiivoja ja sieniä ja etenkin voidaan käyttää mikro-organismeja, jotka kuuluvat sukuihin Absidia, Branhamella, Graphium, Trichosporon tai Arthrobacter.

Nämä mikro-organismit valitaan niiden kyvyn mukaisesti kuluttaa stereoselektiivisesti R -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia. Yleensä mikro-organismit voivat olla sellaisia,

- a. joita on esitetty kirjallisuudessa organismeina, jotka pystyvät hapettamaan yhdisteitä, jotka ovat muita kuin tutkittavat yhdisteet,
- b. jotka kuuluvat samaan lajiin kuin kohdassa a. on esitetty, mutta jotka ovat eri kantakokoelmasta ja on eristetty eri lähteestä,
- c. kuuluvat samaan sukuun kuin kohdassa a. esitetyt, mutta joista ei vielä tiedetä, että ne voivat hapettaa,
- d. joiden on osoitettu pystyvän kasvamaan substraateilla, jotka tarvitsevat ensimmäisen hapetus- tai hydroksylointivaiheen näiden substraattien hajotuksessa.

Keksinnön eräässä suoritusmuodossa mikro-organismit, jotka pystyvät kuluttamaan stereoselektiivisesti R -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia, voidaan valita käyttämällä R -2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia C-lähteenä sopivassa alustassa.

Useita luonnollisista lähteistä, etenkin maanäyhteistä eristettyjä mikro-organismeja valittiin yllä esitetyn analyysimenetelmän mukaisesti ja alistettaessa ne muihin tes-

teihin, kuten on esitetty myöhemmin, ne osoittivat kykynsä hapettaa stereoselektiivisesti \underline{R} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia.

Mikro-organismit voidaan eristää erilaisista ympäristöistä, esim.

- öljyvuodoista,
- alueilta, jotka ovat saastuneet orgaanisilla kemiallisilla yhdisteillä,
- vahamaisilta alueilta, kuten esim. kasvien pinnoilta,
- lahoavasta luonnollisesta orgaanisesta aineesta,
- luonnollisista ympäristöistä, joissa tutkittava yhdiste (tai läheinen yhdiste) voi esiintyä.

Samoin käsitteeseen "mikro-organismit, jotka pystyvät stereoselektiiviseen kulutukseen" kuuluvat mikro-organismit, jotka ovat muuttuneet kykeneviksi kuluttamaan \underline{R} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia sisällyttämällä niihin uusi geneettinen aine.

Tämä voidaan suorittaa siirtämällä kloonattu geeni, joka koodaa polypeptidin, joka vastaa stereoselektiivisestä kulutuksesta, entsyymin, jostakin analysoidusta mikro-organismista toiseen mikro-organismiin, etenkin Escherichia coliin.

Toiset mikro-organismit voivat kuulua sukuihin Saccharomyces, Kluyveromyces, Bacillus, Nocardia, Rhodococcus, Escherichia tai Corynebacterium. Kloonatut geenit voidaan valita niiden kyvyn perusteella koodata entsyymi, joka pystyy kuluttamaan \underline{R} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia \underline{S} -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin eduksi. Vaihtoehtoisesti ne voidaan valita ristihybridisoimalla jo valitun geenin kanssa, joka pystyy koodaamaan entsyymin stereoselektiivistä kulutusta varten.

Mikro-organismit voivat olla edullisesti immobilisoituja, esimerkiksi polymeerigeelille. Tämä voidaan suorittaa kasvavilla soluilla, ei-kasvavilla soluilla ja/tai tapetuilla soluilla, vaihtoehtoisesti sopivilla niistä muodostetuilla entsyymeillä, jotka voidaan puhdistaa määrättyssä määrin, jos tarvitaan suurempaa spesifistä aktiivisuutta.

Siten käsite "mikro-organismit tai niistä muodostetut aineet" tarkoittaa mikro-organismeja kasvavassa tilassa, ei-kasvavassa tilassa tai tapettuina, niistä saatuja uutteita, jotka on mahdollisesti konsentroitunut tai puhdistettu. Esimerkiksi voidaan käyttää entsyymejä, mahdollisesti yhdessä esimerkiksi keinotekoisien tai luonnollisten ko-faktoreiden kanssa. Voidaan käyttää ei fermentatiivisesti aktiivisia soluja $R_2-2,2-R_1, R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanolin kulutukseen. On todettu, että entsyymit, jotka on muodostettu soluista tai tapetuista soluista, voivat kuluttaa R -isomeeriä sopivissa olosuhteissa. Mikro-organismeja tai niistä muodostettuja aineita voidaan käyttää useita kertoja ja ne ovat aktiivisia vähintään 2 viikkoa. Jopa ilman ko-substraattia (esimerkiksi glukoosia) mikro-organismit voivat pysyä aktiivisina. $2,2-R_1, R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanolin S-isomeeri-rikastus voi tapahtua sopivassa puskurissa (esimerkiksi 3-(N-morfolino)propaani-sulfonihapossa, tris(hydroksimetyyli)aminometaanissa tai kaliumfosfaatisa) samoin kuin fysiologisissa suoloissa. Varastoinnin jälkeen indusoitujen solujen on todettu pystyvän suoraan S-isomeeri-rikastukseen.

Etenkin mikro-organismit $R_2-2,2-R_1, R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanolin kuluttamiseksi voivat olla Absidia glaucan (tämän lajin näyte on talletettu CBS-talletusnumerolla 306.89), Branhamella catarrhalisin (tämän lajin näyte on talletettu CBS-talletusnumerolla 307.89) tai Graphinum penicillioidesin (tämän lajin näyte on talletettu CBS-talletusnumerolla 318.72), Trichosporon adeninovoransin

ei kuvattu

(tämän lajin näyte on talletettu CBS-talletusnumerolla 8244) tai Bacterium F-7:n (tämän lajin näyte on talletettu CBS-talletusnumerolla 238.90). Viljelmä Bacterium F-7 on todennäköisesti suvun Arthrobacter tai Actinomycetes laji.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettua S-2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanolia voidaan käyttää lähtöaineena muiden optisesti aktiivisten yhdisteiden valmistamiseksi. Eräs tärkeä mahdollisuus on kiraalisten lääkeaineiden valmistus.

Alan ammattihenkilölle lienee selvää, että voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa menetelmää S- ja R-2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanolin muuntamiseksi toisiksi optisesti aktiivisiksi yhdisteiksi.

Esimerkit, jotka havainnollistavat S- ja R-2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanolin käyttöä optisesti aktiivisten yhdisteiden valmistamiseksi, ovat tunnettuja esimerkiksi julkaisusta J. Jurczak et al., Tetrahedron report number 195, Tetrahedron 42 (1986), s. 447 - 488 ja Janssen Chemican (Belgia) julkaisusta the Technical Information Bulletin 225, syyskuu 1983.

Optisesti aktiivisia yhdisteitä voidaan käyttää farmaseutisissa tai maanviljelystuotteissa.

Tämän keksinnön menetelmän erään edullisen suoritusmuodon mukaisesti mikro-organismia, joka pystyy kuluttamaan stereoselektiivisesti R-2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanolia, viljellään n. 0,5 - 10 päivän ajan, minkä jälkeen mikro-organismin solut suspendoidaan nestemäiseen ravintoalustaan ja R- ja S-2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanolin seos alistetaan solujen vaikutukselle.

Yllä esitetyn, n. 0,5 - 10 päivää kestävästä viljelystä jälkeä solut voidaan eristää viljelyalustasta ennen solujen suspendoimista nestemäiseen ravintoalustaan.

Mikro-organismien kasvattamiseksi, joita käytetään R-2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanolin kuluttamiseksi stereoselektiivisesti, voidaan käyttää tavanomaisia viljelyalustoja, jotka sisältävät assimiloituvan hiililähteen (esim. glukoosi, laktaatti, sakkaroosi jne.), assimiloituvan typpilähteen (esim. ammoniumsulfaatti, ammoniumnitraatti, ammoniumkloridi jne.), orgaanisen ravintolähteen (esimerkiksi hiivauute, mallasuute, peptoni, lihauute jne.) ja epäorgaanisen ravintolähteen kanssa (esimerkiksi fosfaatti, magnesium, kalium, sinkki, rauta ja muita metalleja pieninä määrinä).

Eräs toinen edullinen viljelyalusta on YPD-alusta, joka on mahdollisesti rikastettu yhdellä tai useammalla aineella. Voidaan käyttää YPD-alustaa, joka sisältää 20 g/l Bactopeptonea (TM), 10 g/l hiivauutetta ja 20 g/l glukoosia. Ennen käyttöä alustaa steriloidaan edullisesti 30 minuutin ajan 110°C:ssa.

Eräs toinen edullinen viljelyalusta on kuoritusta maidosta koostuva alusta, joka on rikastettu yhdellä tai useammalla aineella, esimerkiksi kuoritusta maidosta koostuva alusta, joka sisältää 10 % kuorittua maitoa, joka on peräisin kuoritun maidon jauheesta, ja alustaa steriloidaan edullisesti 30 minuutin ajan 110°C:ssa ennen käyttöä.

Esimerkkeinä rikasteista, joita voidaan käyttää kuoritusta maidosta koostuvassa alustassa, mainittakoon Maxatase (TM) (Gist-brocades).

Mikro-organismin kasvatuksen aikana lämpötila pidetään edullisesti 0 - 45°C:ssa ja pH arvossa 3,5 - 9. Edullisesti mikro-organismia kasvatetaan 20 - 37°C:ssa ja pH-arvossa 5 - 9. Mikro-organismin kasvun aikana tarvittavat aerobiset olosuhteet voidaan saada aikaan jollakin hyvin tunnetulla menetelmällä, edellyttäen, että hapen syöttö on

riittävä mikro-organismien metabolisten vaatimusten täyttämiseksi. Tämä toteutetaan edullisimmin syöttämällä hap-
pea, edullisesti ilman muodossa, ja ravistelemalla tai se-
koittamalla reaktionestettä samanaikaisesti. Kulutettaessa
 $R-2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanolia mikro-organismien
avulla mikro-organismi voi olla kasvavassa tilassa käyt-
tämällä mainittua tavanomaista viljelyalustaa.

Kulutettaessa $R-2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanolia mik-
ro-organismien avulla voidaan käyttää tavanomaista viljely-
alustaa, joka sisältää tarvittaessa assimiloituvaa hiili-
lähdettä (esimerkiksi glukosia, laktaattia, sakkaroosia
jne.), tarvittaessa assimiloituvaa typpilähdettä (esimer-
kiksi ammoniumsulfaattia, ammoniumnitraattia, ammoniumklo-
ridia jne.) tarvittaessa orgaanisen ravintolähteen kanssa
(esim. hiivauute, mallasuute, peptoni, lihauute jne.) ja
tarvittaessa epäorgaanisen ravintolähteen kanssa (esimer-
kiksi fosfaatti, magnesium, kalium, sinkki, rauta ja muita
metalleja pieninä määrinä).

Edullisesti S-isomeeri-rikastuksen aikana voidaan käyttää
BHI-, PSIII-suola-alustaa, hydrolysoidusta kuoritusta mai-
dosta koostuvaa alustaa, YPD-alustaa (kuten yllä on esi-
tetty) tai kuoritusta maidosta koostuvaa alustaa (kuten
yllä on esitetty), joka on mahdollisesti rikastettu yhdel-
lä tai useammalla aineosalla.

Voidaan käyttää BHI- (aivot-sydän-infuusio) alustaa, joka
sisältää 0,037 g/l BHI:tä (Oxoid (TM)) ja jonka pH on sää-
detty arvoon 7,0. Ennen käyttöä tätä alustaa steriloidaan
edullisesti 20 minuutin ajan 120°C:ssa.

Voidaan käyttää seuraavan koostumuksen omaavaa PSIII-suola-
alustaa:

kaliumdivetyfosfaattia (2,1 g/l),
ammoniummonovetyfosfaattia (1,0 g/l),

ammoniumsulfaattia (0,9 g/l),
 kaliumkloridia (0,2 g/l),
 natriumsitraattia (0,29 g/l),
 kalsiumsulfaatti·2H₂O:ta (0,005 g/l),
 magnesiumsulfaatti·7H₂O:ta (0,2 g/l),
 ammoniumrauta(II)-sulfaatti·6H₂O:ta (2,5 mg/l),
 sinkkisulfaatti·7H₂O:ta (0,5 mg/l),
 mangaanikloridi·4H₂O:ta (0,3 mg/l),
 kuparisulfaatti·5H₂O:ta (0,15 mg/l),
 kobolttikloridi·6H₂O:ta (0,15 mg/l),
 ortoboorihappoa (0,05 mg/l),
 natriummolybdaatti·2H₂O:ta (0,055 mg/l) ja
 kaliumjodidia (0,1 mg/l). pH on säädetty arvoon 6,8. Ennen
 käyttöä PSIII-suola-alustaa steriloidaan edullisesti 30
 minuutin ajan 120°C:ssa.

Hydrolysoidusta kuoritusta maidosta koostuva alusta:
 100 g/l kuoritusta maidosta koostuvaa jauhetta (Oxoid
 (TM)) säädetään pH-arvoon 7,8 ja lisätään 25 ml suodatet-
 tua Maxatasen (40 g/l) liuosta, sekoitetaan lopullista
 liuosta 40°C:ssa tunnin ajan ja säädetään pH arvoon 7,0.
 Ennen käyttöä alustaa steriloidaan sopivasti 30 minuutin
 ajan 110°C:ssa.

Mikro-organismi voidaan pitää ei-kasvavassa tilassa esi-
 merkiksi jättämällä pois assimiloituva hiililähde tai jät-
 tämällä pois typpilähde. Tämän vaiheen aikana lämpötila
 voidaan pitää 0 - 45°C:ssa ja pH arvossa 3,5 - 9.

Edullisesti mikro-organismit pidetään 20 - 37°C:n lämpöti-
 lassa ja pH-arvossa 5 - 9. Tämän vaiheen aikana tarvitta-
 vat aerobiset olosuhteet voidaan saada aikaan jollakin hy-
 vin tunnetulla menetelmällä edellyttäen, että hapen syöttö
 on riittävä mikro-organismien metabolisten vaatimusten
 täyttämiseksi. Tämä saadaan aikaan sopivimmin syöttämällä
 happea, sopivasti ilman muodossa ja mahdollisesti raviste-

lemalla tai sekoittamalla reaktionestettä samanaikaisesti. S- ja mahdollinen jäljellä oleva R-2,2-R₁,R₂-1,3-diokso-laani-4-metanoli voidaan ottaa talteen ja puhdistaa muuntamisen jälkeen, kuten yllä on mainittu, jollakin sinänsä tällaisten tuotteiden yhteydessä tunnetulla menetelmällä.

Mikro-organismit voidaan pitää agar-vinoviljelmien päällä, jäädyttää 50%:isessa glyserolissa tai lyofilisoida. Tarvittaessa näiden mikro-organismien esiviljelmät voidaan valmistaa jonkin hyvin tunnetun menetelmän mukaisesti, esimerkiksi mikro-organismeja voidaan inkuboida lihaliemessä tai BHI:ssä (Brain Heart Infusion) 24 tunnin ajan 30°C:ssa kiertoravistimessa. Voidaan käyttää seuraavan koostumuksen omaavaa lihaliemialustaa: Lab Lemco L 29:ää (lihauute, Oxoid (TM) 9 g/l), Bactopeptone'a (TM) (10 g/l) ja natriumkloridia (5 g/l), pH säädetty arvoon 7,6. Ennen käyttöä tätä alustaa steriloidaan sopivasti 20 minuutin ajan 120°C:ssa.

Tätä keksintöä selitetään lähemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

Mikro-organismeja (hiivoja ja sieniä) kasvatettiin 24 - 48 tunnin ajan 26°C:ssa 125 ml:n väliseinillä varustetuissa pulloissa, jotka sisälsivät YPD-alustaa. Tämän jälkeen so-lumassa kerättiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen 25 ml:aan 10%:ista hydrolysoidusta kuoritusta maidosta koostuvaa alustaa (hydrolysoidusta kuoritusta maidosta koostuva alusta: kuoritusta maidosta valmistettua jauhetta (Oxoid) 100 g/l, säädetään pH arvoon 7,8 ja lisätään 25 ml suodatettua Maxatasen (TM) (40 g/l) liuosta. Lopullista liuosta sekoitetaan 40°C:ssa tunnin ajan ja pH säädetään arvoon 7,0. Sterilointi: 30 min. 110°C:ssa). Lisättiin n. 1,5 g/l R,S-2,2-dimetyyli-1,3-diokso-laani-4-metanolia (ra-

seeminen seos). Seoksia ravisteltiin 125 ml:n väliseinillä varustetuissa pulloissa 26°C:ssa 48 tunnin ajan.

Seokset uutettiin 25 ml:lla etyyliasetaattia. Tällä tavalla otettiin talteen n. 40 % 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. Tämän jälkeen otettiin yksi viljelmä kustakin muodosta, uutettiin ja analysoitiin jäljelle jäävä 2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanoli. Enantiomeerinen jakautuma määritettiin muodostamalla diastereoisomeerit N,O-bis-(trimetyylisilyyli)-trifluoriasetamidilla (BSTFA), jotka erotettiin kiraalikompleksointipylväällä. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Mikro-organismi	g/l*	Enantiomeerisuhte	
		R %	S %
<u>Absidia glauca</u> (CBS 306.89)	1,3	43	57
<u>Branhamella catarrhalis</u> (CBS 307.89)	1,9	33	67
<u>Graphium penicillioides</u> (CBS 318.72)	1,1	29	71

* Esitetyt arvot on korjattu uuttamisen aiheuttaman häviön suhteen.

Esimerkki 2

Mikro-organismia Branhamella catarrhalis CBS 307.89 kasvatettiin 24 - 48 tunnin ajan 26°C:ssa 100 ml:n väliseinillä varustetuissa pulloissa, jotka sisälsivät 25 ml YPD-alustaa. Solumassa kerättiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen 25 ml:aan 10%:ista hydrolysoidusta kuoritusta maidosta koostuvaa alustaa, joka sisälsi 1,5 g R,S-2,2-di-

metyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. Seoksia ravisteltiin 100 ml:n väliseinillä varustetuissa pulloissa 26°C:ssa 48 tunnin ajan.

Seokset uutettiin 25 ml:lla etyyliasetaattia. Tällä tavalla otettiin talteen n. 40 % 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. Tämän jälkeen otettiin yksi viljelmä kustakin muodosta, uutettiin ja analysoitiin jäljelle jäävä 2,2-R₁,R₂-1,3-dioksolaani-4-metanoli. Enantiomeerinen jakautuma määritettiin muodostamalla diastereoisomeerit N,O-bis-(trimetyylisilyyli)-trifluoriasetamidilla (BSTFA), jotka erotettiin kiraalikompleksointipylväällä CP Cyclodex B 236 M GC:llä. S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin todettiin kattavan 67 % koko 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolistä (1,3 g/l).

Esimerkki 3

Mikro-organismia Trichosporon adeninovorans CBS 8244 esikasvatettiin 100 ml:n väliseinillä varustetuissa erlenmeyerpulloissa, jotka sisälsivät 25 ml YPD-alustaa, ravisteluinkubaattorissa 30°C:ssa 24 - 48 tunnin ajan. 1 ml viljelmän näytteitä lisättiin 100 ml:n erlenmeyerpulloihin, jotka sisälsivät 25 ml BHI:tä tai hydrolysoidusta kuoritusta maidosta koostuvaa alustaa.

R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia lisättiin 2,0 g/l:n lopulliseen konsentraatioon. 48-tuntisen inkubaation jälkeen R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin enantiomeerinen jakautuma määritettiin esimerkissä 2 esitetyllä tavalla.

Alustan koostumus	2,2-dimetyyli-1,3-diok- solaani-4-metanolin määrä (g/l)	Enantiomeeri- jakautuma	
		R %	S %
BHI	1,8	47	53
hydrolysoitu kuo- rittua maito	1,8	45	55

Esimerkki 4

Mikro-organismia Graphium penicillioides CBS 318.72 esi-
kasvatettiin 100 ml:n väliseinillä varustetuissa erlen-
meyerpulloissa ravisteluinkubaattorissa 30°C:ssa 24 - 48
tunnin ajan. 1 ml viljelmän näytteitä lisättiin BHI-,
PSIII- ja hydrolysoidusta kuoritusta maidosta koostuvan
alustan 25 ml:n inokuloimiseksi, jotka sisälsivät kukin 2
g/l R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia 100 ml:n
erlenmeyerpulloissa. Inkuboitiin 48 tunnin ajan 30°C:ssa,
minkä jälkeen jäljellä oleva R,S-2,2-dimetyyli-1,3-diokso-
laani-4-metanoli mitattiin esimerkissä 2 esitetyllä taval-
la.

Alustan koostumus	2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin määrä (g/l)	Enantiomeerijakautuma	
		R %	S %
BHI	1,4	40	60
PSIII + 0,1 % glyserolia + 0,01 % hiivauutetta	1,6	48	52
hydrolysoitu kuorittu maito	1,5	45	55

Esimerkki 5

R-muoto
→ happe

Mikro-organismit, jotka pystyivät muuntamaan enantiospesifisesti R-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin vastaavaksi hapoksi 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin R,S-seoksesta, eristettiin käyttämällä seuraavaa menetelmää. 1 g maanäytettä suspendoitiin PSIII:hin ja sentrifugoitiin. Supernatantti lisättiin 25 ml:aan PSIII-alustaa, joka sisälsi 1 g/l R-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. Viljelmää inkuboitiin ravisteluinkubaattorissa 30 tunnin ajan 30°C:ssa. Laimennokset kerrostettiin agar-levyille, jotka sisälsivät 1 g/l R-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia ja 4 päivää 30°C:ssa kestäneen inkubaation jälkeen yksittäiset solukoloniat eristettiin, kunnes saatiin aikaan monoviljelmät. Tämän jälkeen eristeitä esiviljeltiin BHI-alustalla 30°C:ssa 24 tunnin ajan ja testattiin kyky hapettaa spesifisesti R-enantiomeeri 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin R,S-seoksessa. Käytettiin 1 ml alustan 25 ml:n inokuloimiseksi 100 ml:n erlenmeyer-pullossa, joka sisälsi PSIII:tä, 0,1 % glyserolia, 0,01 % hiivauutetta ja 1,5 g/l R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. 48 tuntia 30°C:ssa kestäneen inkubaa-

tion jälkeen jäljellä oleva R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanoli määritettiin esimerkissä 2 esitetyllä tavalla. Käyttämällä tätä valintamenetelmää eristettiin mikro-organismeja, jotka pystyivät hapettamaan enantiospesifisesti R-isomeerin 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin R,S-seoksessa ja siten rikastamaan S-isomeerin. Esimerkkibakteerina F-7 talletettiin CBS-laitokseen.

Esimerkki 6

Bacterium F-7:ää (CBS 238.90) esiviljeltiin 25 ml:ssa nestemäistä BHI-alustaa 100 ml:n erlenmeyer-ravistelupulloissa. Soluja kasvatettiin 24 tunnin ajan 30°C:ssa ravisteluinkubaattorissa.

Tämän jälkeen 1 ml tätä viljelmää käytettiin alustan 25 ml:n inokuloimiseksi, joka sisälsi PSIII:tä, 0,1 % glyserolia (w/v), 0,01 % hiivauutetta (w/v) ja 1,5 g/l R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. 48 tuntia 30°C:ssa kestäneen inkubaation jälkeen seokset uutettiin ja analysoitiin esimerkissä 2 esitetyllä tavalla. Otettiin talteen 0,2 g/l 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin S-enantiomeeriä ja 0,01 g/l R-enantiomeeriä, mikä vastasi S-enantiomeerin 90 %:n enantiomeeristä ylimäärää.

Esimerkki 7

Bacterium F-7:ää (CBS 238.90) esiviljeltiin edellä esitetyllä tavalla. Käyttämällä samaa menetelmää inokuloitiin 4 erlenmeyerpulloa (ilman väliseiniä), jotka sisälsivät PSIII:tä ja vaihtelevia määriä R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. 72 tuntia kestäneen inkubaation jälkeen jäljellä oleva R- ja S-enantiomeeri määritettiin edellä esitetyllä tavalla.

Lähtö-2,2-dimetyyli- 1,3-dioksolaani-4- metanoli (g/l)	2,2-dimetyyli-1,3- dioksolaani-4-meta- nolin määrä (g/l)	enantiomeeri- jakautuma	
		R %	S %
1,5	0,28	15	85
2,5	0,42	24	76
5,0	0,57	33	67

Esimerkki 8

Bacterium F-7:ää (CBS 238.90) esiviljeltiin BHI-alustalla esimerkissä 5 esitetyllä tavalla. 1 ml viljelmää käytettiin PSIII-alustan inokuloimiseksi, joka sisälsi 2,5 g/l R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia, ja kasvatettiin ravisteluinkubaattorissa 30°C:ssa 72 tunnin ajan. Tämän jälkeen jäljellä oleva R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanoli määritettiin esimerkissä 2 esitetyllä tavalla ja 0,42 g/l otettiin talteen. 76 % R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolista todettiin S-isomeeriksi.

Käyttämällä HPLC-tekniikkaa todettiin 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-karboksyylihappo. Inkubaatioalusta käsiteltiin perkloorihapolla 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-karboksyylihapon hydrolysoimiseksi asetoniksi ja glyserolihapoksi ja tämä mitattiin HPLC:llä käyttämällä Aminex HPX 87 H-laitetta (Biorad).

Edelleen tutkittiin, mikä hapon enantiomeeri valmistettiin. Happo erotettiin happamaksi tehdystä inkubaatioalustasta uuttamalla käyttämällä $CDCl_3$:a. R- ja S-enantiomeeri erotettiin lisäämällä naftyylietyyliamiinia ja muodostettiin diastereoisomeerit. Protoni-NMR osoitti, että 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-karboksyylihappo esiintyi 80%:isesti S-enantiomeerinä.

Esimerkki 9

Absidia glauca (CBS 306.89) esikasvatettiin 25 ml:ssa BHI-alustaa 100 ml:n väliseinillä varustetuissa pulloissa ravisteluinkubaattorissa 30°C:ssa 24 - 48 tunnin ajan. 1 ml viljelmän näytettä lisättiin BHI-alustan 25 ml:n inokuloimiseksi, joka sisälsi 1,5 g/l R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolia. 48-tuntisen inkubaation jälkeen R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolin enantiomeerinen jakautuma määritettiin esimerkissä 2 esitetyllä tavalla ja todettiin, että 55 % R,S-2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanolista esiintyi S-enantiomeerinä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä S-isomeeri-rikkaan 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin valmistamiseksi, jossa R_1 ja R_2 merkitsevät toisistaan riippumatta vetyä tai alkyyliryhmää, joka on mahdollisesti substituoitu tai haarautunut, tai jossa R_1 ja R_2 muodostavat yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, karbosyklisen renkaan, joka on mahdollisesti substituoitu, t u n n e t t u siitä, että R - ja S-2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin seos alistetaan mikro-organismin tai siitä muodostetun aineen vaikutukselle, joka pystyy kuluttamaan stereoselektiivisesti R -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia, sellaisen aikajakson ajaksi, että seoksen R -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia kulutetaan S-isomeeri-rikkaan 2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolin tuottamiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aikajakso on sellainen, että kulutetaan vähintään 50 % R -2,2- R_1, R_2 -1,3-dioksolaani-4-metanolia.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alkyyliryhmät sisältävät vähemmän kuin 6¹ hiiliatomia tai että karboksyklinen rengas sisältää vähemmän kuin 8 hiiliatomia.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_1 ja R_2 ovat identtisiä.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_1 ja R_2 merkitsevät vetyä tai 1 - 3 hiiliatomia sisältävää alkyyliryhmää tai ne muodostavat yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, 5 tai 6 hiiliatomia sisältävän karbosyklisen renkaan.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on bakteeri, hiiva tai sieni, joka kuuluu etenkin sukuihin Absidia, Branhamella, Graphium, Trichosporon tai Arthrobacter.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty mikro-organismi on Absidia glauca, etenkin Absidia glauca (CBS 306.89), Branhamella catarrhalis, etenkin Branhamella catarrhalis (CBS 307.89), Graphium penicillioides, etenkin Graphium penicillioides (CBS 318.72), Trichosporon adeninovorans, etenkin Trichosporon adeninovorans (CBS 8244) tai Bacterium F-7 (CBS 238.90) tai näiden mutantti.

8. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi tai siitä muodostettu aine immobilisoidaan joko kasvavana soluna, ei-kasvavana soluna, tapettuna soluna tai entsyyminä.

9. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kulutettu $R-2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanoli muunnetaan olennaisesti $S-2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-karboksylihapoksi. Lisädata 9.10.8

10. Menetelmä R-isomeeri-rikkaan $2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanolin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksen 9 mukainen $S-2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-karboksylihapo muunnetaan $R-2,2-R_1,R_2-1,3$ -dioksolaani-4-metanoliksi. S → R

11. Mikro-organismi, joka on jokin seuraavista:
Absidia glauca (CBS 306,89),
Branhamella catarrhalis (CBS 307.89),
 Bacterium F-7 (CBS 238.90) ja näiden mutantit.

11.10.8
 ei kuitenkaan
 tarkennettu kunnolla
 selityksessä

PATENTTIHAK. NRO 903314	LUOKKA C12P	TUTKIJA Ne	TUTKIMUSTUL. SAATU EP US						
TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US		TUTK. KESK. *)						
C12P 41	X	X	X	X					
17	X	X	X	X					
C12N 1	X	X	X	X					

*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA

KÄÄNNÄ!

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA,
HAKUSANAT YM.)

Chemical Abstracts 101 (1984) 23 377 w
(Mukaiyama et al)

HELSINKI

15.9.94
PÄIVÄYS

Mina Järvelin
ALLEKIRJOITUS