

(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
197943 B

(22) A bejelentés napja: 86.03.21. (21) 1202/86

(33) IT:
(32) 85.03.22.
(31) 20036/A/85

(51) Int.Cl.
C 12 P 7/62



(41) (42) A közzététel napja: 1987.03.30.

(45) Megjelent: 1990.02.26.

(72) Feltalálók:
CESTI Pietre, Martine Di Trecate, Novara,
PICCARDI Paolo, Milánó, IT

(71) Bejelentő:
Montedison S.P.A., Milánó, IT

(54) ELJÁRÁS OPTIKAILAG AKTÍV ALFA- α -ARIL-ALKÁNSAVAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA BIOTECHNOLÓGIAI ÚTON

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás S(+)- α -aril-alkánsavak előállítására, oly módon, hogy egy (I) általános képletű racém észtert — a képletben

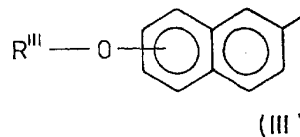
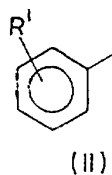
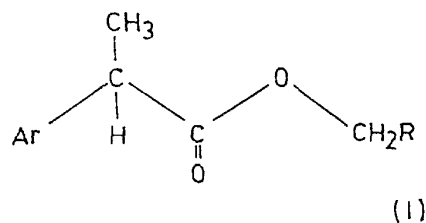
R jelentése etinil-, etenil-, ciano-, acetyl-, (1—4 szénatomos)alkoxi-karbonil- vagy (1—4 szénatomos)alkoxi-metil-csoport,

Ar jelentése (II) vagy (III) általános képletű csoport, az utóbbi képletekben

R' jelentése 1—6 szénatomos egyenes vagy elágazó szénláncú alkilcsoport, 2—4 szénatomos alkenilcsoport, fenilcsoport, fenoxycsoport vagy ketocsoporttal helyettesített dihidro-izindolil-csoport,

és
R'' jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport —

egy Candida-nemzetségbe tartozó mikroorganizmus által termelt észterázzal aszimmetrikusan hidrolizálnak, majd az S(+)-formában lévő szabad savat az R(—)-formában lévő reagálatlan észtertől elválasztják.



A találmány tárgya eljárás optikai S(+)- és R(—)-izomerek formájában rezolvált aril-alkánsavak előállítására, biotechnológiai úton.

Közelebbről, a találmány lényegében S(+)-izomer formájában lévő α -aril-alkánsavak biotechnológiai előállítására vonatkozik.

Bizonyos α -aril-alkánsavak, közelebbről az α -aril-propionsavak, mint nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatású vegyületek Shen T. [Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 11,460 (1972)] munkájából ismertek.

A fenti vegyületek — mivel α -helyzetben egy aszimmetriacentrumot tartalmaznak — két optikai izomer — S(+)- és R(—)-enantiomerek — formájában létezhetnek.

Ezenkívül a fenti irodalmi helyről az is ismert, hogy az egyik enantiomer gyulladáscsökkentő aktivitása nagyobb, mint a másiké, ez a helyzet az α -metil-aril-ecetsavak csoportjába tartozó, a kereskedelmi forgalomban ibuprofen, naproxen, fenoprofen, stb. néven ismert vegyületek esetén is.

Az S(+)-enantiomer aktivitása rendszerint meghaladja az R(—)-enantiomerét, ez a helyzet például az ibuprofen [Adams S.S. és munkatársai: Journal Pharm. Pharmacy 28, 256 (1976)], vagy a naproxen esetében is, az utóbbi vegyület esetén az S(+)-enantiomer aktivitása közel 28-szor nagyobb, mint az R(—)-enantiomeré.

A fenti savak optikai izomerjeinek elválasztása is ismert, például Kaiser D.G. és munkatársai [J. Pharm. Science 2, 269 (1976)], és Frank A. és Richards C. [Chemistry Letters 1431—1434 (1984)] munkájából.

Azonban a két optikai izomer rezolválására szolgáló ismert módszerek bonyolultak, drága, optikailag aktív reaktánsokat — például metil-benzil-amint vagy egyéb hasonló királis vegyületeket — kell alkalmazni, és a legtöbb esetben nem érhető el megfelelő hozam ahhoz, hogy az eljárás ipari méretekben is gazdaságos legyen.

A fentieknek megfelelően olyan módszert kidolgozásra volt szükség, amelynek segítségével a fenti savak optikai izomerjeinek rezolválását egyszerű és olcsó módon, ipari méretekben is gazdaságosan valósíthatjuk meg.

Célunk tehát olyan eljárás kidolgozása volt az α -aril-alkánsavak optikai izomerjeinek elválasztására, amely egyszerű és gazdaságos, és ipari méretekben is előnyös.

További célunk volt, hogy az α -aril-alkánsavakat lényegében S(+)-enantiomerjük formájában nyerjük ki, magas hozammal.

Vizsgálataink szerint, ha a racém α -aril-alkánsav-észtereket biotechnológiai eljárással enzimatisz aszimmetrikus hidrolízisnek vetjük alá, S(+)-izomer formában gazdag szabad savat kapunk.

A gyakorlatban a fenti célra egy mikroorganizmus által termelt olyan enzimet használunk, amely képes a fenti savak racém ész-

tereit aszimmetrikusan hidrolizálni, azaz képes a racém észterek S(+)-enantiomerjeinek szelektív hidrolízisére, és a reakció termékeként olyan savat kapunk, amely lényegében S(+)-izomer formájában van, míg az R(—)-izomer formában lévő észter lényegében változatlan marad.

Az S(+)-savat az R(—)-észtertől egyszerűen elválaszthatjuk.

10

A találmány értelmében a lényegében S(+)-izomer formájában lévő α -aril-alkánsavak biotechnológiai szétválasztását úgy valósítjuk meg, hogy egy racém (R, S) (I) általános képletű α -aril-alkánsav-észtert — a képletben

15

R jelentése etinil-, etenil-, ciano-, acetyl-, (1—4 szénatomos)alkoxi-karbonil- vagy (1—4 szénatomos)alkoxi-metil-csoport,

20

Ar jelentése egy (II) vagy (III) általános képletű csoport, az utóbbi képletekben

R' jelentése 1—6 szénatomos, egyenes vagy elágazó szénláncú alkilcsoport, 2—4 szénatomos alkenilcsoport, fenilcsoport, fenoxycsoport vagy ketocsoporttal szubsztituált dihidro-izindolidil-csoport.

25

és

R'' jelentése 1—4 szénatomos alkilcso-

30

port — egy Candida nemzetségbe tartozó mikroorganizmus által termelt észterázzal aszimmetrikusan hidrolizálunk, és a kapott S(+)-formában lévő savat az R(—)-formában lévő reagálatlan észtertől elválasztjuk.

35

Az (I) általános képletű racém észtereket ismert észterezési eljárásokkal állíthatjuk elő, például az 1., 2. és 3. reakcióvázlat szerinti eljárásokkal.

40

A találmány szerinti eljárásban észterázzal vízben oldódó lipázt használhatunk, amelyet Candida-nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok termelnek.

45

A találmány szerinti eljárásban különösen előnyösen a Candida cylindracea mikroorganizmus által termelt lipázt használjuk, amelynek letétbe helyezési száma az American Type Culture Collection-nél (ATCC) 14830.

50

A fenti lipáz kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető. A fenti lipázt termelő mikroorganizmust önmagában ismert módon tenyésztjük, például oly módon, hogy a mikroorganizmust sterilizált folyékony táptalajra leoltjuk és rázatás közben 20—40°C-on 1—3 napon át tenyésztjük.

55

Az (I) általános képletű racém észterek aszimmetrikus hidrolízisét úgy játszhatjuk le, hogy a racém észterek elegyét intenzíven összekeverjük nyers vagy tisztított észterázzal, amely valamely folyadékban, így vízben, vagy a mikroorganizmus tápfolyadékában, vagy annak extraktumában vagy koncentrátumában, vagy a mikroorganizmus-sejtek szuszpenziójában lehet.

65

Az enzimet különféle szubsztráthoz kötött állapotban is használhatjuk, a szubsztrátot önmagában ismert módon választhatjuk meg.

A találmány szerinti eljárást 10 és 60°C közötti hőmérsékleten folytathatjuk le, előnyösen 20 és 40°C közötti hőmérsékleten dolgozunk, míg a reakcióelegy pH-értékét 5 és 9 között tartjuk, előnyösen 6 és 8 közötti pH-értéket biztosítunk, az enzim az utóbbi pH-érték közelében mutat legnagyobb aktivitást.

A reakcióelegy pH-ját vagy pufferoldattal tartjuk állandó értéken, vagy a reakció során felszabadult savat bázissal — például kálium-hidroxiddal, nátrium-hidroxiddal, stb. — semlegesítjük.

A reakcióelegyben a kiindulási anyagként használt racém észterek koncentrációja 1 és 20 tömeg% között változhat.

Az aszimmetrikus hidrolízis reakcióideje 5 és 64 óra között lehet, az alkalmazott enzim fajlagos aktivitásától függően, amely általában az enzim tisztasági fokától függ.

Az aszimmetrikus hidrolízis reakció befejeztével a reakcióelegyből extrahálhatjuk az S(+)-izomerben gazdag savat, és a reagálatlan, R(—)-izomerben gazdag észtert. Az extrahálást vízzel nem elegyedő szerves oldószerekkel — például metilén-kloriddal, toluollal, ligroinnal, etil-éterrel vagy egyéb hasonló oldószerekkel — végezhetjük.

Az így kapott szerves extraktumból koncentráció után elválaszthatjuk a főleg S(+)-izomer formájában lévő savat a főleg R(—)-izomer formájában lévő észtertől, oly módon, hogy az extraktumot kromatográfiás oszlopon vezetjük keresztül, amelyben álló fázisként például szilikagél használunk.

Az S(+)-enantiomerben gazdag savat úgy is elválaszthatjuk a reakcióelegyből, hogy a reakcióelegyet bázissal — például 5%-os vizes nátrium-hidroxid-oldattal vagy 10%-os vizes kálium-hidroxid-oldattal — extraháljuk.

Az R(—)-enantiomerben gazdag, hidrolizálatlan észtert — melyet a fenti módon választottunk el — ezután racemizálhatjuk, például vízmentes közegben bázissal kezelve, majd a találmány szerinti eljárásban újra felhasználhatjuk, mint kiindulási anyagot, azaz újra alávethetjük az enzimátikus aszimmetrikus hidrolízisnek.

Bonyolultabb, és általában kevésbé célszerű módon úgy is eljárhatunk, hogy a fenti R(—)-észtert R(—)-savvá hidrolizáljuk, majd a savat racemizáljuk, és újra észterezzük, végül a kapott R,S-racém észtert vezetjük vissza a találmány szerinti eljárás kiindulási anyagaként a folyamatba.

A találmányt közelebbről — a korlátozás szándéka nélkül — az alábbi példák segítségével kívánjuk ismertetni.

1. példa

S(+)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsav előállítás

100 ml 0,2 mól/l koncentrációjú nátrium-hidrogén-foszfát-kálium-dihidrogén-foszfát

pufferoldathoz (pH 7) 2,92 g (R,S)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsav-etoxi-karbonil-metil-észtert és 400 mg, *Candida cylindracea* mikroorganizmusból nyert lipáz enzimet (gyártja a SIGMA Chemical Co., USA, 30% protein-tartalom, aktivitása 1400–2800 egység/mg protein) adunk.

A reakcióelegyet 24 órán át 28°C-on intenzíven keverjük. Az elegyet ezután metilén-kloriddal extraháljuk. Az extraktumot nagy nyomású folyadékkromatográfiás eljárással analizáljuk (Erbasil RP-18, CH₃CN/H₂O 75/25, 254 nm, UV-detektálás) és az átalakulás mértékét a képződött sav és az átalakulatlan észter csúcsainak arányából számítjuk ki.

A nagy nyomású folyadékkromatográfiás vizsgálat szerint az átalakulás mértéke 45%, ami az S(+)-forma 90%-os hidrolízisének felel meg. Az extraktumot koncentráljuk és oszlopkromatográfiás eljárással tisztítjuk, álló fázisként szilikagél, és eluensként hexán és éter 3:1 arányú elegyét használva.

A sav szerkezetét NMR-analízissel bizonyítjuk.

A kapott cím szerinti szilárd termék olvadáspontja 49°C, optikai forgatóképessége $[\alpha]_D^{20} = +55,55^\circ$ (c=1, etanol). A gáz-folyadék-kromatográfiás analízis szerint a termék, mint S(—)- α -metil-benzamid-származék optikai tisztasága $\geq 95\%$.

2. példa

100 ml 0,1 mól/l koncentrációjú kálium-klorid-oldathoz 2,4 g (R,S)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsav-propargil-észtert és 400 mg, *Candida cylindracea*-ból nyert lipáz enzimet adunk, amelynek jellemzőit az 1. példában ismertettük.

A reakcióelegyet 37°C-on intenzíven keverjük, miközben a pH-értéket 0,5 mól/l koncentrációjú kálium-hidroxid-oldat adagolásával 6,8 értéken tartjuk.

48 óra elteltével a vizes kálium-hidroxid-oldat fogyásából számítva az átalakulás közel 40%-os, az S(+)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsavra nézve.

A termék elválasztását és vizsgálatát az 1. példában ismertetett módon végezzük. A kapott szilárd termék optikai forgatóképessége $[\alpha]_D^{20} = +54,9^\circ$ (c=1, etanol), olvadáspontja 49°C.

3. példa

500 ml-es lombikba 100 ml tápfolyadékot helyezünk, amelynek összetétele: 10 g glükóz, 5 g pepton, 3 g maláta kivonat és 2 g élesztőkivonat, 1000 ml vízben oldva, pH-ját 6,8-ra állítjuk.

A tápfolyadékot sterilizáljuk, majd leoltjuk a *Candida cylindracea* ATCC 14830 ferde agarról vett tenyészetével, és 30°C-on 52 órán át tenyésztjük, 350 fordulat/perc sebességgel mozgó rotációs rázógépen.

A tenyészet pH-ját 0,5 mól/l koncentrációjú vizes kálium-hidroxid-oldattal 7-re állít-

juk, majd hozzáadunk 2,92 g (R,S)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsav-etoxi-karbonil-metil-észtert. Az elegyet 30°C-on 48 órán át keverjük, miközben a pH-értéket 0,5 mól/l koncentrációjú vizes kálium-hidroxid-oldattal állandó értéken tartjuk.

A termék elválasztását és vizsgálatát az 1. példában ismertetett módon végezzük. Az S(+)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsav (konverzió 38%) optikai forgatóképessége $[\alpha]_D^{20} = +53,2^\circ$ (c=1, etanol), olvadáspontja 48°C.

4. példa

2-(6-Metoxi-2-naftil)-propionsav előállítása

100 ml 0,3 mól/l koncentrációjú nátrium-hidrogén-foszfát-kálium-dihidrogén-foszfát pufferoldathoz 3,2 g 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav-ciano-metil-észtert és 500 mg 1. példa szerinti *Candida cylindracea* lipáz enzimet adunk. Az elegyet 32°C-on 52 órán át inten-

1. táblázat

Példa száma	/I/ általános képletű racém észter /R,S/	Racém észter /R,S/	<i>Candida cylindracea</i> lipáz enzim /g/	Puffer-oldat /ml/	Reakció-idő /óra/	R,S-észter konverzió /%/	S(+)-észter konverzió /%/
5.	/a/	-CH=CH ₂	2	0,2	50	45	96
6.	/b/	-CO-CH ₃	3	0,2	100	30	68
7.	/c/	-CN	3	0,4	70	42	76
8.	/d/	-COOCH ₃	4	0,4	100	28	59
9.	/e/	-CN	2	0,2	50	24	92
10.	/f/	-CH ₂ OC ₂ H ₅	3	0,5	70	32	60

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás lényegében S(+)-izomer formában lévő α -aril-alkánsavak előállítására biotechnológiai úton, *azzal jellemezve*, hogy egy (I) általános képletű racém (R,S)- α -aril-alkánsav-észtert — a képletben

R jelentése etinil-, etenil-, ciano-, acetyl-, (1—4 szénatomos)alkoxi-karbonil- vagy (1—4 szénatomos)alkoxi-metil-csoport,

Ar jelentése (II) vagy (III) általános képletű csoport, az utóbbi képletekben

R' jelentése 1—6 szénatomos egyenes vagy elágazó szénláncú alkilcsoport, 2—4 szénatomos alkenilcsoport, fenilcsoport, fenoxycsoport vagy ketocsoporttal helyettesített dihidro-izoin-dolil-csoport, és

R'' jelentése 1—4 szénatomos alkilcsoport —

egy *Candida*-nemzetségbe tartozó mikroorganizmus által termelt észterázzal aszimmetri-

ziven keverjük. Vizsgálataink szerint az (R,S)-racém észter megfelelő S(+)-savvá alakulása 40%.

A termék elválasztását és vizsgálatát az

5 1. példában ismertetett módon végezzük.

A terméket acetone és hexán elegyből kristályosítjuk. Olvadáspontja 154°C, $[\alpha]_D^{20} = +65,14^\circ$ (c=1, kloroform).

5—10. példa

Az 1. példában leírtak szerint járunk el, nátrium-hidrogén-foszfát-kálium-dihidrogén-foszfát pufferoldatot (pH 6,5) használunk, a reakcióhőmérséklet 32°C. A reakciókat és reakcióidőt az 1. táblázatban ismertetjük.

15 S(+)-savakat az 1. táblázatban ismertetett konverziókkal kapjuk, a konverziókat mind a racém (R,S)-észterre, mind az S(+)-észterre számítottuk. A kapott termékek optikai tisztasága minden esetben nagyobb, mint 90%.

kusan hidrolizálunk, majd az S(+)-formában lévő szabad savat az R(—)-formában lévő reagálatlan észtertől elválasztjuk.

45 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Candida cylindracea* által termelt lipázt használunk.

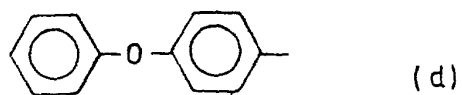
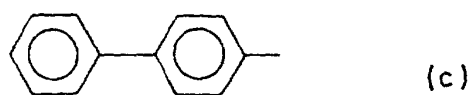
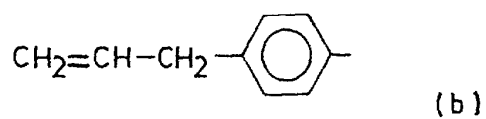
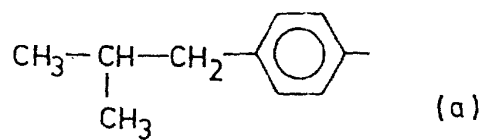
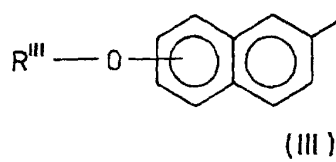
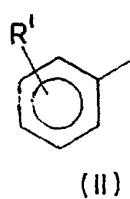
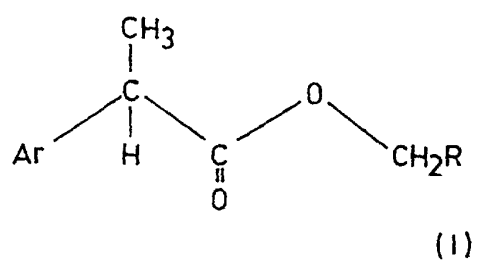
50 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy észterázként a mikroorganizmus sejtekben, vagy a tápfolyadékban, vagy azok extraktumában vagy koncentrátumában lévő enzimet használunk.

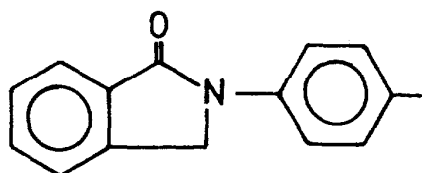
55 4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aszimmetrikus hidrolízist pH 5 és 9 közötti értéken játszátjuk le.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióhőmérsékletet 20 és 40°C között tartjuk.

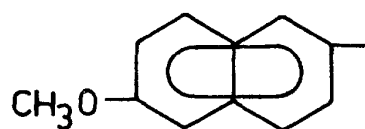
60 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) általános képletű racém észtert a reakcióelegyben 1 és 20 tömeg% közötti koncentrációban használjuk.

3 lap rajz képletekkel

Int.Cl₄ C 12 P 7/62

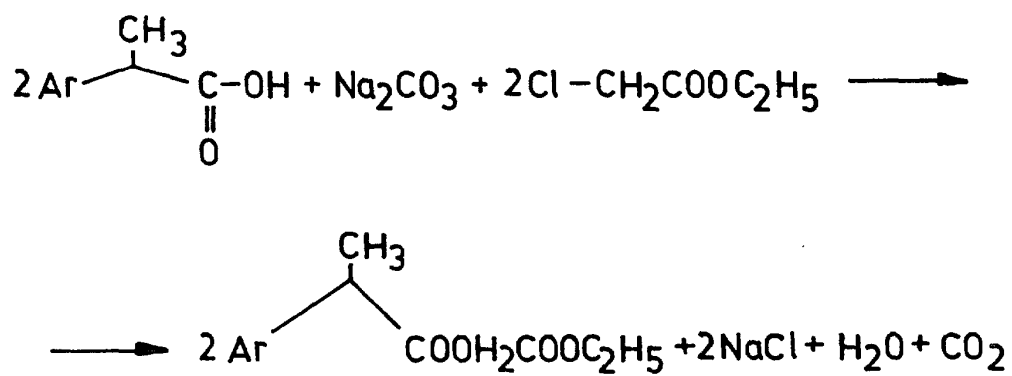


(e)

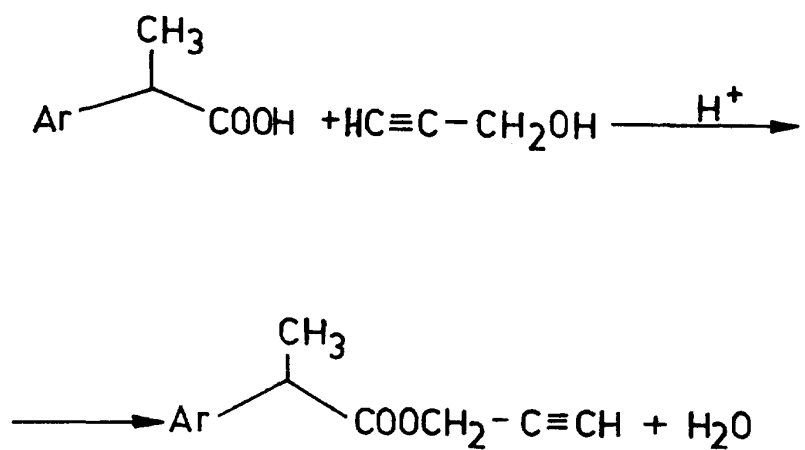


(f)

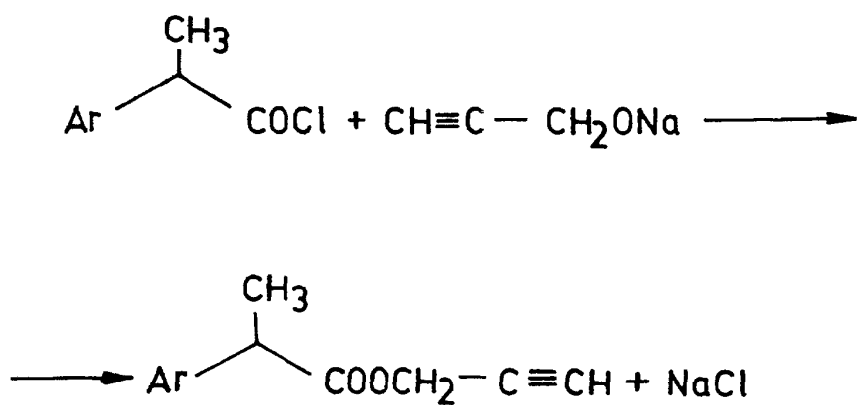
1. reakcióvázlat



2. reakcióvázlat



3. reakcióvázlat



Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 8506. Nyomdaipari vállalat, Ungvár