



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

258141
(11) (B2)

- (22) Přihlášeno 20 05 86
(21) (PV 3658-86.U)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 29 05 85
(P 35 19 548.7)
Německá spolková republika
(40) Zveřejněno 12 11 87
(45) Vydáno 15 12 88

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 31/00
C 07 D 317/72
C 07 D 307/935
//C 12 R 1/72

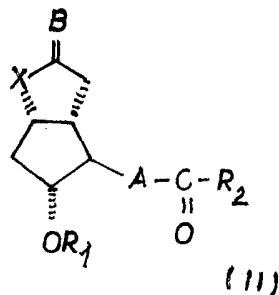
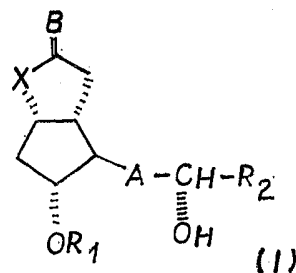
- (72) Autor vynálezu PETZOLDT KARL dr., DAHL HELMUT dr., SKUBALLA WERNER dr.,
ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)
(73) Majitel patentu SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)

(54) Způsob mikrobiologické výroby 15 α -hydroxyprostacyklinových meziproduktů

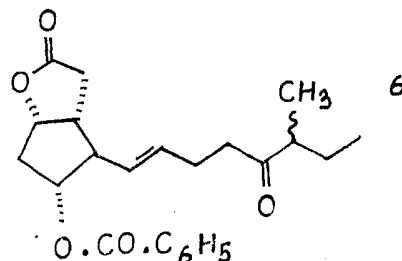
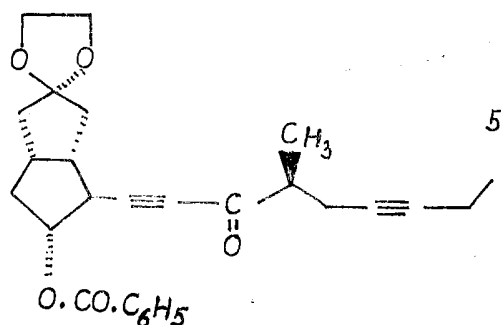
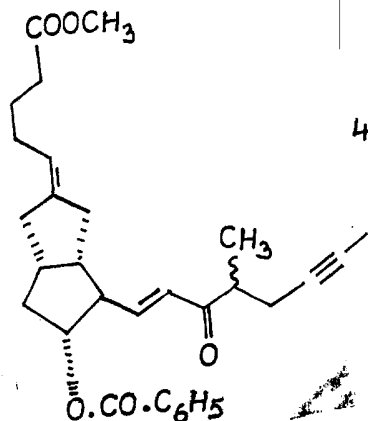
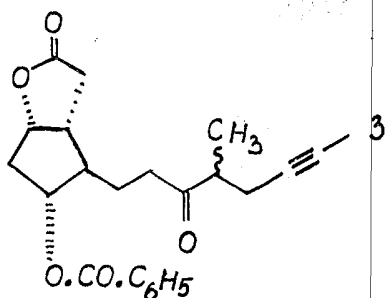
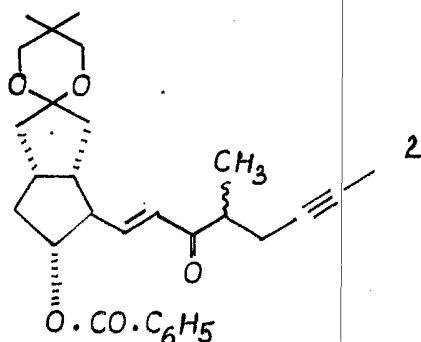
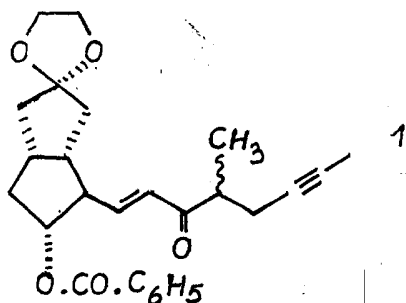
1

Způsob mikrobiologické výroby 15 α -hydroxyprostacyklinových meziproduktů obecného vzorce I, vyznačující se tím, že se na keton obecného vzorce působí kmenem *Candida solani*, který je uložen v německé sbírce mikroorganismů v Göttingenu pod číslem DSM 3 315 nebo kmenem *Pichia farinosa*, který je uložen tamtéž pod číslem DSM 3 316, přičemž se jako rozpouštědel substrátu používá methanolu, ethanolu, glykolmonomethyletheru, dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu, nebo se substrát používá v emulgované formě a po ukončení fermentace se vzniklý 15 α -hydroxyprostacyklinový derivát izoluje.

2



Vynález se týká způsobu mikrobiologické výroby 15 α -hydroxyprostacyklinových meziproduktů. Vynález je vhodný zejména k mikrobiologické redukci dále uvedených prostacyklinových meziproduktů 1 až 6.



Mikrobiologická redukce shora uvedených prostacyklinových meziproduktů se provádí podle tohoto vynálezu pomocí následujících kmenů mikroorganismů: *Candida solani* (NCYC 41) a *Pichia farinosa* (CBS 185). Zejména pak se z těchto kmenů osvědčil kmen *Candida solani*.

Z EP 12 710 je znám následující stav techniky: Zatímco chemická redukce 15-ketoskupin u prostaglandinů a prostaglandinových meziproduktů, například borohydridem sodným, vede pouze přes směsi příslušných 15 α - a 15 β -hydroxysloučenin a v důsledku následujícího dělení jen za ztrát na výtěžcích k žádaným 15 α -hydroxyprostaglandinům, je z USA pat. spisu č. 3 687 811 známa řada mikroorganismů, které převádějí 15-ketoskupinu v 1-hydroxy-15-oxoprostaglandinech vždy podle přítomné konformace 11-hydroxyskupiny na odpovídající trans-15-hydroxyskupinu. Díky způsobu podle německého zveřejňovacího spisu č. 23 57 815 disponuje stav techniky mikrobiologickou metodou, kterou se například převádí 11-hydroxy-15-oxoprostaglandin na směs 11 α -, 15 α - a 11 β -, 15 β -dihydroxyprostaglandinů. Cis-uspořádání 11 α -, 15 α -hydroxylových skupin odpovídá stejné situaci v biologicky aktivních prostaglandinech.

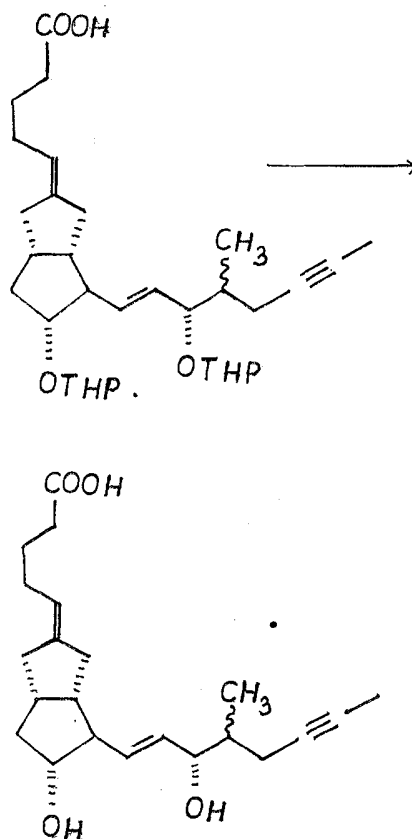
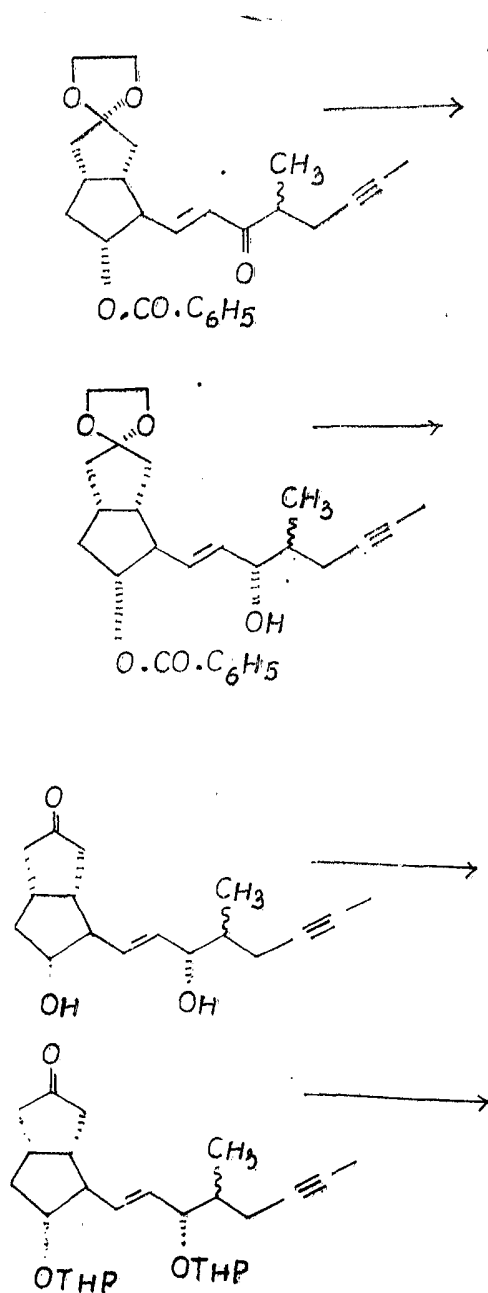
Způsob popsaný v německém zveřejňovacím spise č. 24 01 761 selhává právě tak, jako všechny uvedené způsoby.

Kmeny *Kloeckera*, *Saccharomyces* a *Hansenula* uvedené v EP 12 710 redukují 17-ketoskupinu v prostacyklinových meziproduktech jenom částečně a výtěžky prostacyklinových meziproduktů s 15 α -hydroxyskupinou jsou velmi špatné.

Nyní bylo nalezeno, že výše uvedené prostacyklinové meziprodukty lze redukovat ve

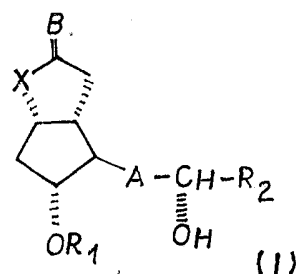
velmi dobrých výtěžcích enantioselektivně na příslušné 15α -hydroxysloučeniny, použije-li se kmenů *Candida* nebo *Pichia*.

Z 15α -hydroxysloučenin připravených způsobem podle vynálezu lze za zachování centra asymetrie v poloze 15 připravit farmakologicky účinné prostacykliny. Například z (1S,2S,5R)-7,7-ethyldioxy-3-benzoyloxy-2-[(1E),(4R)-4-methyl-3-oxo-okt-1-en-6-in-yl]bicyklo[3.3.0]oktanu (1) se dospěje vícestupňovou syntézou k účinné látce iloprostu (popsaného v EP 11 591):



Různé druhy uvedených tříd mikroorganismů vykazují pochopitelně rozdíly v účinnosti redukce podle vynálezu. Použití kmene *Candida solani* (NCYC 41), jakož i *Pichia farinosa* (CBS 185) poskytuje dobré výtěžky, přičemž redukce kmenem *Candida solani* (NCYC 41) poskytuje obzvláště vysoké výtěžky.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob mikrobiologické výroby 15α -hydroxyprostacyklinových meziproduktů obecného vzorce I

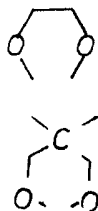


ve kterém

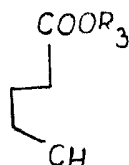
X znamená atom kyslíku nebo methylenovou skupinu,

A znamená trans-CH=CH— nebo —C≡C—skupinu,

B znamená atom kyslíku, skupinu



nebo

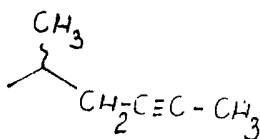
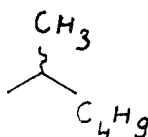


příčemž

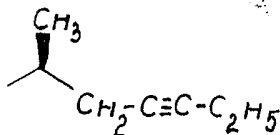
R3 znamená alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,

R1 znamená atom vodíku, tetrahydropyranovitou skupinu, benzoylovou skupinu, terc.butyldimethylsilylovou skupinu nebo terc.butyldifenylsilylovou skupinu a

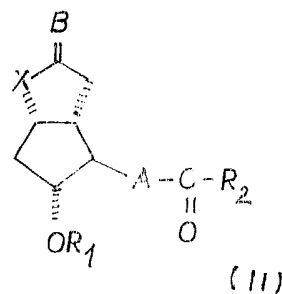
R2 znamená skupinu



nebo



který spočívá v tom, že se na keton obecného vzorce II



ve kterém

A, B, X, R1 a R2 mají shora uvedený význam, který je uložen v Německé sbírce mikroorganismů v Göttingenu pod číslem DSM 3315, nebo kmene *Pichia farinosa*, který je uložen v Německé sbírce mikroorganismů v Göttingenu pod číslem DSM 3316, přičemž se jako rozpouštědel substrátu používá methanolu, ethanolu, glykolmonomethyletheru, dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu, nebo se substrát používá v emulgované formě a po ukončení fermentace se vzniklý 15 α -hydroxyprostacyklinový derivát izoluje.

C1—C4 allylové skupiny značí methylovou, ethylovou, propylovou, isopropylovou, butylovou, isobutylovou, sek.butylovou a terc.butylovou skupinu.

Způsob je obzvláště výhodný, když R1 ve sloučeninách obecného vzorce II značí benzoylovou skupinu.

Podle toho, jaký je žádaný význam R1, lze chránici skupiny odštěpovat o sobě známými způsoby.

Nejdříve se pěstují za obvykle používaných podmínek pro uvedené mikroorganismy ve vhodném živném prostředí za vzdušnění submerzní kultury. Potom se ke kulturám přidá substrát (rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle nebo s výhodou ve formě emulze) a provádí se fermentace, až se dosáhne maximální přeměny substrátu.

Vhodnými rozpouštědly substrátu jsou například methanol, ethanol, glykolmonomethylether, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid. Emulgaci substrátu lze provést například tak, že se v mikronizované formě nebo rozpuštěný v rozpouštědle mísitelném s vodou (jako je methanol, ethanol, aceton, glykolmonomethylether, dimethylformamid, dimethylsulfoxid) a za silné turbulence vmíchá do vody (s výhodou zbavené vápníku), která obsahuje obvyklý emulgátor. Vhodnými emulgátory jsou neionogenní emulgátory, jako například ethylenoxidové adukty nebo estery mastných kyselin s polyglykoly. Vhod-

nými emulgátory jsou například komerční smáčedla Tegin^(R), Tagat^(R) a Span^(R).

Často umožňuje emulgace substrátu jeho větší prosazení a tím i zvýšení jeho koncentrace. Je ale pochopitelně rovněž možné používat při způsobu podle vynálezu i jiné způsoby zvyšování prosazení substrátu, jak je to známo odborníkovi zabývajícímu se fermentacemi.

Optimální koncentrace substrátu, doba přidávání substrátu a doba fermentace závisí na struktuře použitého substrátu a druhu použitého mikroorganismu. Tyto veličiny musí být zjištěny, jak je to obvykle při mikrobiologických přeměnách nutné pro jednotlivé případy předběžnými pokusy, jak je to odborníkovi běžné.

Kmeny *Candida solani* (NCYC 41) a *Pichia farinosa*. (CBS 185) byly uloženy v Německé sbírce mikroorganismů pod čísly DSM 3315 a DSM 3316 dne 21. 5. 1985.

Následující příklady provedení slouží k vysvětlení způsobu podle vynálezu.

Příklad 1

Dvoulitrová Erlenmeyerova baňka, která obsahuje 500 ml živného prostředí, sterilizovaného při teplotě 120 °C v autoklávu, sestávajícího z 1,5 % monohydrátu glukózy, 0,5 % kvasničného extraktu (Difco), 0,5 % kukuřičného výluhu a 0,5 % síranu amonného, s hodnotou pH 6,3, se naočkuje kulturou ze šikmého agaru kmene *Candida solani* (NCYC 41) a po dobu 2,5 dne se třepe při teplotě 30 °C na rotační třepačce.

Pomocí 250 ml této očkovací kultury se naočkuje 20litrový očkovací tank, do kterého se vnese 15 litrů živného prostředí, sterilizovaného po dobu 30 minut při teplotě 121 °C a přetlaku 15 Pa stejného složení jako očkovací kultura. Za přidání Silikonu SH jako prostředku proti pění se při teplotě 25 °C a přetlaku 9 Pa za vzdušnění (15 litrů/min) a míchání (220 ot/min) po dobu 36 hodin kultivuje.

Potom se odebere 0,9 litru této očkovací kultury za sterilních podmínek a naočkuje se jí 20litrový hlavní fermentační tank, který obsahuje 10 litrů sterilizovaného živného prostředí stejného složení jako očkova-

cí kultura. Po 6 hodinách růstové fáze za podmínek jako při očkovací kultuře se přidají za dalšího míchání a provzdušňování 4 g [1S,2S,3R,5R]-7,7-ethyldioxy-3-benzoyloxy-3-[(1E),(4RS)-4-methyl-3-oxo-okt-1-en-6-ynyl]bicyklo[3,3,0]oktanu rozpuštěného ve 100 ml dimethylformamidu.

Po uplynutí doby vzájemného styku 90 hodin je reakce ukončena. Kultivační kapalina se extrahuje třikrát methylisobutylketonem, extrakty se spojí a odpaří se za sníženého tlaku k suchu. Olejovitý odparek se vyjme methanolem, odfiltruje od silikonového oleje a opět se odpaří k suchu. Zbýlý olejovitý surový produkt se rozpustí v methylenchloridu a dále se čistí chromatografickým na sloupci silikagelu za použití směsi 5 litrů hexanu, 4 litrů hexanu + 1 litru acetonu jako elučního činidla. Takto se získá 2,75 g čistého [1S,2S,3R,5R]-7,7-ethyldioxy-3-benzoyloxy-2-[(1E),(3S,-4RS)-3-hydroxy-4-methylokt-1-en-6-ynyl]bicyklo[3,3,0]oktanu ve formě bezbarvého oleje.

Příklad 2

Postupuje se stejným způsobem jako v příkladu 1, avšak k požadované redukci ketonu použije kmene *Pichia farinosa* (CBS 185).

Příklad 3

Za podmínek uvedených v příkladu 1 se k žádané redukci ketonu použije kmene *Pichia farinosa* (CBS 185).

Příklad 4

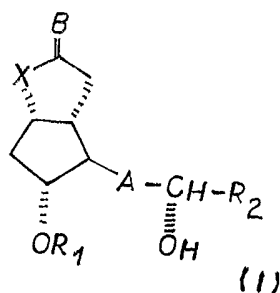
Za podmínek uvedených v příkladu 1 se sloučenina 3 redukuje pomocí kmene *Candida solani* (NCYC 41) na příslušnou 15 α -hydroxysloučeninu.

Příklad 5

Za podmínek uvedených v příkladu 1 se redukuje sloučenina 5 pomocí kmene *Candida solani* (NCYC 41) na příslušnou 15 α -hydroxysloučeninu.

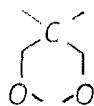
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob mikrobiologické výroby 15 α -hydroxyprostacyklinových meziproduktů obecného vzorce I

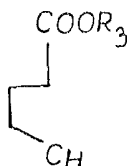


kde

X značí atom kyslíku nebo CH_3 -skupinu,
 A trans- $\text{CH}=\text{CH}$ - nebo $-\text{C}\equiv\text{C}$ -skupinu,
 B atom kyslíku, zbytky



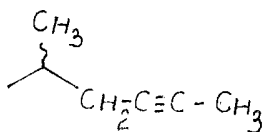
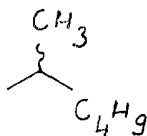
nebo



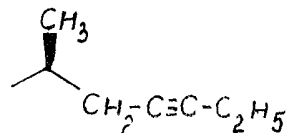
kde

R_3 má význam C_1 – C_4 -alkylové skupiny,
 R_1 značí atom vodíku, tetrahydropyrany-
 lovou nebo terc.butyldifenylsilylovou sku-
 pinu a

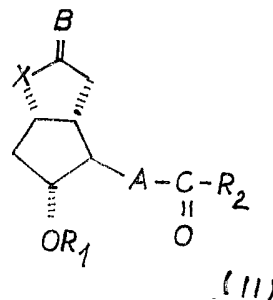
R_2 značí zbytky



nebo



vyznačující se tím, že na keton obecného
 vzorce II



(III)

kde

A, B, X, R_1 a R_2 mají výše uvedený vý-
 znam, působí kmenem *Candida solani*, kte-
 rý je uložen v Německé sbírce mikroorga-
 nismů v Göttingenu pod číslem DSM 3 315
 nebo kmenem *Pichia farinosa*, který je ulo-
 žen v Německé sbírce mikroorganismů v
 Göttingenu pod číslem DSM 3 316, přičemž
 se jako rozpouštědel substrátu používá me-
 thanolu, ethanolu, glykomonomethylethe-
 ru, dimethylformamidu nebo dimethyl-
 sulfoxidu, nebo se substrát používá v emul-
 gované formě a po ukončení fermentace se
 vzniklý 15α -hydroxyprostacyklinový deri-
 váť izoluje.