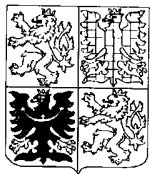


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.10.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.10.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/106233**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.05.2000**
(Věstník č. 5/2000)

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3790

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 7/22

C 07 C 29/136

(71) Přihlašovatel:

PFIZER PRODUCTS INC., Groton,
CT, US;

(72) Původce:

Morse Brook Knight, Colchester, CT, US;
Truesdell Susan Jane, Warwick, RI, US;
Wong John Wing, East Lyme, CT, US;

(74) Zástupce:

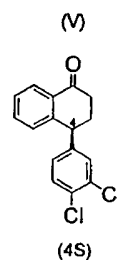
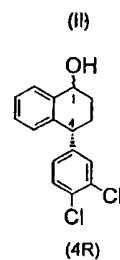
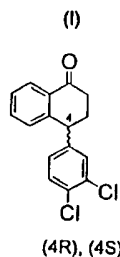
Hofejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Stereoselektivní mikrobiální redukce
racemického tetralonu**

(57) Anotace:

Způsob zahrnuje styk racemického tetralonu vzorce I s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem schopným provést předmětnou redukci, obsahujícím enzym odvozený z uvedeného mikroorganismu a kofaktor pro uvedený enzym, a poté inkubaci výsledné směsi za podmínek dostatečných pro získání (4R)-tetralolu vzorce II a ponechání v podstatě nezreagovaného (4S)-tetralonu vzorce V nebo "chirálního tetralonu". Chirální tetralon může být použit při syntéze sertralínu. Předmětný způsob případně zahrnuje separaci (4S)-tetralonu vzorce V od (4R)-tetralolu vzorce II. (4R)-tetralol může být recyklován k vytvoření sloučeniny vzorce I a předmětný způsob opakován.



Stereoselektivní mikrobiální redukce racemického tetralonu

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových způsobů přípravy (4S)-enantiomeru 4-(3,4-dichlorfenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-naftalenonu (zde také označovaného jako "chirální tetralon" nebo "(4S)-tetralon" a zejména se týká stereoselektivní mikrobiální redukce racemického 4(3,4-dichlorfenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-naftalenonu (zde také označovaného jako "racemický tetralon" na chirální tetralon.

Dosavadní stav techniky

Chirální tetralon připravený způsoby předloženého vynálezu může být dále reagován k přípravě čistého cis-(1S)(4S)-N-methyl-4-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftalen-aminu, běžně označovaného jako sertralin. Sertralin je dobře znám jako užitečný například jako antidepresant a anorektický prostředek a při léčení chemických závislostí, poruch spojených s úzkostí, předčasné ejakulace, rakoviny a postmyokardiálního infarktu.

V dosavadním stavu techniky jsou známy metody přípravy sertralínu jako jsou například ty, které jsou popsány v US patentech č. 4 536 518, 4 777 288, 4 839 104, 4 855 500, 4 940 731, 4 962 128, 5 082 970, 5 130 338, 5 196 607, 5 248 699, 5 442 116, 5 463 126, 5 466 880, 5 597 826, a 5 750 794 a v článku W.M.Welcha, jr., a j., který se objevil v Journal of Medicinal Chemistry, sv. 27, č. 11, str. 1 508, (1984).

Některé z výše zmíněných patentů se týkají syntézy směsí cis- a trans-isomerů racemického N-methyl-4-(3,4-dichlor-fenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftalenaminu. Jak je tam popsáno, cis- a trans-isomery, stejně jako jejich (S) a (R) enantio-mery mohou být odděleny způsoby známými odborníkům v oboru včetně například frakční krystalizace nebo chromatografie.

Je také známo vybrat pro konečně požadovanou chirali-tu dřívější postupy při syntéze sertralinu. Například výše zmíněný US patent č. 5 750 794 zveřejňuje způsob přípravy chi-rálního tetralonu reakcí racemického tetralonu s asymetrickým ketonovým redukčním prostředkem, čímž se získají cis- nebo trans-alkoholy v závislosti na chiralitě a symetrického použi-tého reagentu a pak se rozdělí alkoholy a oxidují se (1S,4S) a/nebo (1R,4S) alkoholy na (4S)-tetralon.

Je také známo v dosavadním stavu techniky, že chirální sloučeniny mohou být syntetizovány pomocí mikroorganismů, jako jsou houby, například kvasinky. Například použití kvasinek k redukci ketonu na chirální alkoholy je dobře známo. Avšak jak ocení odborníci v příslušném oboru, chemické a optické výtěžky, například příslušné enantiomery a jejich množství z takovýchto mikrobiálních redukcí obecně kolísají značně v závislosti například na příslušném zvoleném mikroorganismu, stejně jako na substituentech výchozí látky.

US patent č. 5 049 497 zveřejňuje způsob rozložení racemického derivátu bicyklo[4,2,0]oktanu stykem tohoto deri-vátu s Bakerovými kvasinkami za podmínek dostatečných k poskyt-nutí směsi ketonu a alkoholu vysoké enantiomerní čistoty. Jak je tam popsáno, jenom jeden enantiomer příslušného racemického ketonu se redukuje, aby poskytl alkohol.

US patent č. 5 580 764 zveřejňuje asymetrický redukční způsob, který používá intaktního mikroorganismu nebo přípravku z jeho rozrušených buněk k převedení cyklického ketonu na odpovídající chirální alkohol.

US patent č. 5 618 707 zveřejňuje způsob stereoselektivní redukce ketonových substrátů přidavkem těchto substrátů do kultivačního bujónu buď *Zigcsaccharomyces bailii*, ATCC, (Americká sbírka typových kultur) č. 38924 nebo *Schizosaccharomyces octosporus* ATCC č. 2479, inkubací výsledné směsi a izolací hydroxysloučeniny konvenčními prostředky jako je například extrakce organickými rozpouštědly, adsorpce na pryskyřice nebo chromatografie, pro následující použití jako meziprojektu při přípravě prostředku snižujícího sérový cholesterol.

Izolovaná hydroxysloučenina, která je zde popsána byla analyzována chirální vysokovýkonnostní kapalinovou chromatografií (HPLC), HPLC s reversními fázemi nebo oběma. Konzistentně s tím by odborníci v relevantním oboru měli porozumět jak je zde popsáno, mnoho z velkého počtu mikroorganismů, které byly zkoumány pro jejich schopnost redukovat ketonovou skupinu vybraného substrátu, selhalo při redukci ketonové skupiny s požadovanou specifitou nebo produktivitou.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že oblast mikroorganismů, včetně hub, například kvasinek a aktinomycet, podstatně stereoselektivně redukuje racemický tetralon. Specifičtěji předmětná stereoselektivní mikrobiální redukce selektivně redukuje (4R)-tetralon z racemické směsi, přičemž ponechává (4S)-tetralon v podstatě nezreagovaný. Navíc nežádoucí (4R)-tetralol vytvořený předmětným způsobem může být oxidován a pak racemizován na racemický tetralon a předmětný způsob opakován k dosažení dokonce více (4S)-tetralonu.

(4S)-Tetralon vytvořený předmětným způsobem může být použit při syntéze sertálinu.

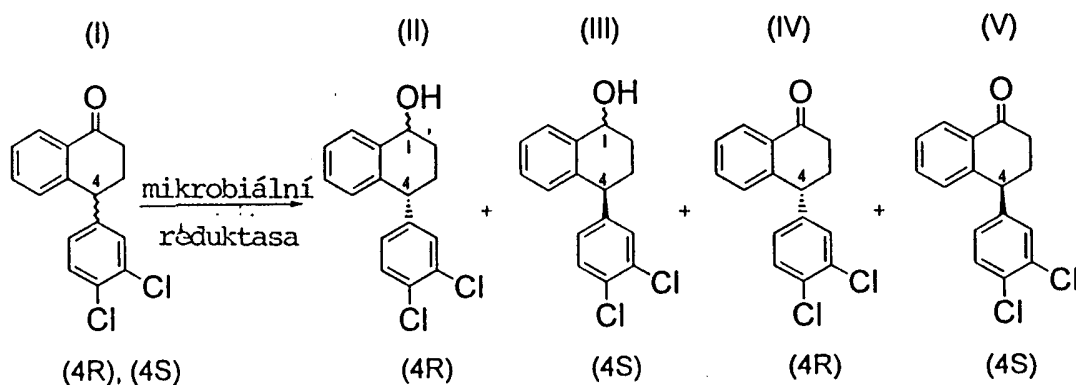
Všechny zde citované dokumenty, včetně předcházejících, jsou zde začleněny jejich odkazem v jejich celistvostech.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká mikrobiální redukce karbonylových skupin, která zahrnuje styk ketonové sloučeniny, racemického tetralonu vzorce I s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem schopným provést předmětnou redukci zahrnujícím enzym odvozený z uvedeného mikroorganismu a kofaktor pro uvedený enzym, a inkubaci výsledné směsi za vhodných podmínek takových, že sloučenina mající hydroxyskupinu, specificky (4R)-tetralol vzorce II může být vytvořena a akumulována v médiu a sloučenina mající požadovanou stereochemii, (4S)-tetralon vzorce V uvedeného dále, zůstává v podstatě nezreagovaná.

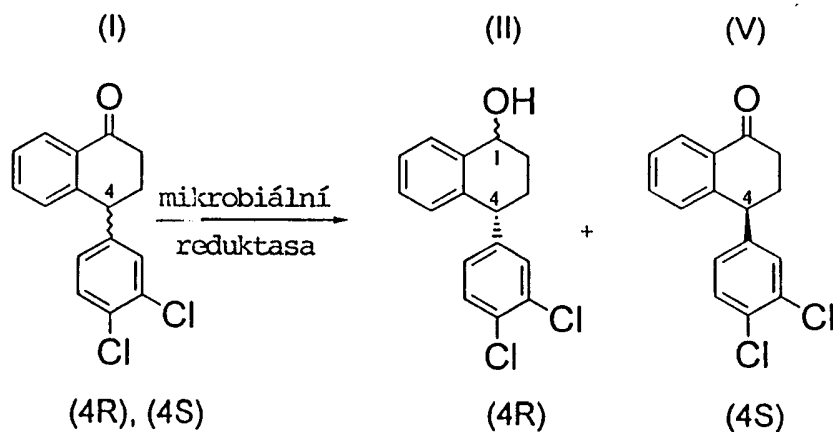
(4S)-Tetralon vzorce V uvedeného dále, to je chirální tetralon, pak může být izolován jakýmkoli vhodným způsobem, například chromatografií nebo krystalizací. Navíc (4R)-tetralol vzorce II může být separován od sloučenin vzorců III až V, oxidován a racemizován na racemický tetralon a předmětná stereoselektivní mikrobiální redukce může být opakována, čímž se získá ještě více požadovaného chirálního ketonu.

V souhlase s tím předložený vynález vytváří způsoby provádění následující stereospecifické mikrobiální redukce:



který zahrnuje styk sloučeniny vzorce I s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem schopným provést předmětnou redukci, zahrnujícím enzym odvozený z uvedeného mikroorganismu a kofaktor pro uvedený enzym, a inkubaci výsledné směsi za podmínek dostatečných k získání většího množství sloučeniny vzorce II než sloučeniny vzorce III, čímž se nechá větší množství sloučeniny vzorce V nezreagované než nezreagované sloučeniny vzorce IV.

Předmětná stereospecifická redukce může být také představena způsobem



který zahrnuje styk sloučeniny vzorce I s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem schopným dosáhnout předmětné redukce, obsahujícím enzym odvozený z uvedeného mikroorganismu a kofaktor pro uvedený enzym, a inkubaci výsledné směsi za podmínek dostatečných k získání (4R)-tetralolu vzorce II a ponechání v podstatě nezreagovaného (4S)-tetralonu vzorce V.

Stereoselektivní redukce dále případně zahrnuje separaci (4S)-tetralonu vzorce V od (4R)-tetralolu vzorce II. (4R)-Tetralol může pak být oxidován k vytvoření (4R)-tetralonu, který se pak nechá reagovat například s bází, čímž se vytvoří racemický tetralon vzorce I a předmětná stereoselektivní mikrobiální redukce může být opakována, aby se získalo ještě více požadovaného (4S)-tetralonu vzorce V, to je (4S)-enantio-meru racemického tetralonu vzorce I.

Předložený vynález vytváří způsoby, které zahrnují stereoselektivní mikrobiální redukci sloučeniny vzorce I na sloučeninu vzorce II stykem sloučeniny vzorce I s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem schopným dosáhnout předmětné redukce, zahrnujícím enzym odvozený z uvedeného mikroorganismu a kofaktor pro uvedený enzym, a inkubaci výsledné směsi za podmínek dostatečných k získání sloučeniny vzorce II, čímž zůstává podstatně více sloučeniny vzorce V nezreagováno než sloučeniny vzorce IV a podstatně více sloučeniny vzorce II se vytvoří oproti sloučenině vzorce III.

Ve výhodném provedení se provede styk sloučeniny vzorce II s enzymovým redukčním systémem.

V dalším výhodném provedení styku sloučeniny vzorce I se provede tento styk s enzymovým redukčním systémem, kde je enzym immobilizován.

Ve zvlášť výhodném provedení styku sloučeniny vzorce I je enzymový redukční systém odvozen z *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012.

V dalším výhodném provedení mikroorganismu je přípravek z jeho rozrušených buněk. V ještě dalším výhodném provedení mikroorganismu je jeho acetonový práškový enzymatický přípravek.

Ve zvlášť výhodném provedení předloženého vynálezu se použije intaktní mikroorganismus. Ve výhodném provedení, kde je mikroorganismem intaktní mikroorganismus, se sloučenina vzorce I uvede do styku s fermentačním médiem, kultivačním bujónem nebo rozpouštědlem obsahujícím mikroorganismus.

V dalším výhodném provedení, kde je mikroorganismus intaktním mikroorganismem, se sloučenina vzorce I uvede do styku s promytým intaktním mikroorganismem. V ještě dalším výhodném provedení, kde je mikroorganismus intaktní, se sloučenina vzorce I uvede do styku s immobilizovaným intaktním mikroorganismem.

Ve zvlášť výhodném provedení předloženého vynálezu je mikroorganismus intaktní mikroorganismu, který je vypěstován ve fermentačním mediu a styk se uskuteční přidavkem sloučeniny vzorce I do tohoto fermentačního media.

V dalším zvlášť výhodném provedení tohoto vynálezu je mikroorganismus intaktní organismus, který je vypěstován v růstovém mediu po dobu asi 48 hodin a styk se uskuteční v tomto růstovém mediu přidavkem sloučeniny vzorce I do něho a inkubace probíhá asi po dobu 5 dnů.

V ještě dalším výhodném provedení tohoto vynálezu je mikroorganizmem buď houba, například kvasinka nebo aktinomyce-
ta nebo jejich mutant, který je schopen provedení stereoselek-
tivní redukce.

V ještě dalším výhodném provedení tohoto vynálezu je mikroorganizmem houba. V ještě dalším výhodném provedení, kde mikroorganizmem je houba, je houbou Absidia coerulea ATCC č. 20137.

Ve zvlášť výhodném provedení tohoto vynálezu je mikro-
organizmem kvasinka. Ve zvlášť výhodném provedení tohoto vyná-
lezu, kde je mikroorganizmem kvasinka, je kvasinkou Hansenula
polymorpha ATCC č. 26012, také uložená jako ATCC č. 74449.

Kde Hansenula polymorpha ATCC č. 26012, také uložená
jako ATCC č. 74449, je použita jako mikroorganizmus, předmětná
stereoselektivní mikrobiální redukce ocenitelně redukuje jen
jeden enantiomer sloučeniny vzorce I, čímž se získá odpoví-
dající alkohol, to je sloučenina vzorce II, přičemž se ponechá-
vá další enantiomer sloučeniny vzorce I, to je sloučenina vzo-
rce V v podstatě nezreagována.

Jak bylo diskutováno dříve, způsoby předloženého vyná-
lezu dále případně zahrnují separaci, například provedenou
použitím krystalizace nebo chromatografie, sloučeniny vzorce
V od sloučenin vzorců II až IV a použití takovéto separované
sloučeniny vzorce V při syntéze sertralinu za použití jakých-
koli známých způsobů.

Jak bylo také diskutováno dříve, je výhodné oxidovat
izolovaný (4R)-tetralol vzorce II na (4R)-tetralon vzorce IV.
Pak je dále výhodné racemizovat, výhodně reakcí (4R)-tetra-

lonu s bází, (4R)-tetralon vzorce IV na racemický tetralon vzorce I. Oxidace a racemizace recykluje nežádaný (4R)-tetralol pro další kolo stereoselektivní mikrobiální redukce podle způsobů předloženého vynálezu.

Recyklace nežádaného (4R)-tetralolu zvyšuje množství požadovaného (4S)-tetralonu a snižuje množství nežádaného vypouštěného (4R)-tetralolu. Oxidace a racemizace oxidovaného produktu se může provádět pomocí jakékoli vhodné známé metody k tomu určené.

Detailní popis vynálezu

Odborníci v oboru plně rozumějí výrazům zde použitým k popsání předloženého vynálezu, nicméně následující zde použité výrazy jsou zde dále popsány.

"Kofaktor" znamená jakýkoli vhodný kofaktor zahrnující enzymový redukční systém jako je například NADH, NADPH, FADH, FMNH a/nebo PQQ, nebo jakýkoli vhodný kofaktor, který se vyskytuje s enzymem v mikroorganismu.

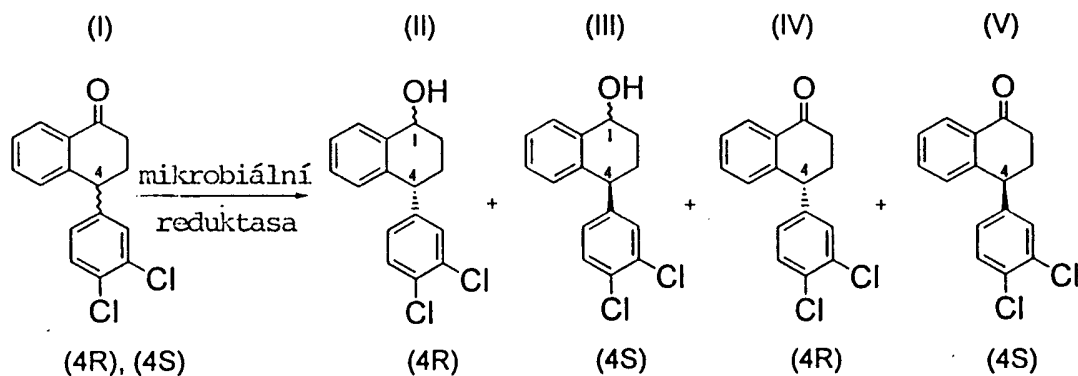
"Enzymový redukční systém" znamená vhodný mikrobiální oxidoreduktasový enzym a redukovanou formu kofaktoru pro oxidoreduktasový enzym, kde tento kofaktor může být buď odvozen z vybraného mikroorganismu nebo může být z jakéhokoli vhodného zdroje. Enzym zahrnující enzymový redukční systém může být buď ve volné nebo immobilizované formě, například v koloně nebo vázaný do zrn.

"Mikrobiální redukce" znamená stereoselektivní redukci předloženého vynálezu jak se provádí enzymovým redukčním sys-

témem, přičemž mikrobiální reduktasa zahrnuje enzymový redukční systém, intaktní mikroorganismus nebo jakýkoli jeho přípravek a podobně.

"Mikroorganismus" zahrnuje jakýkoli intaktní mikroorganismus nebo přípravek z něj, včetně například přípravku z rozrušených buněk mikroorganismu, dehydratovaný přípravek z mikroorganismu, například acetonový práškový enzymatický přípravek, mikroorganismus promytý volný z například fermentačního media, kultivačního bujónu a podobně, mikroorganismus imobilizovaný, například v koloně, vázaný do zrn a podobně.

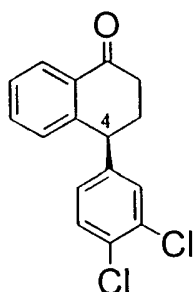
Způsoby vytvořené předloženým vynálezem zahrnují stereoselektivní mikrobiální redukci sloučeniny vzorce I na sloučeninu vzorce II



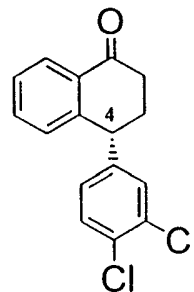
stykem sloučeniny vzorce I s mikroorganismem nebo enzymovým redukčním systémem schopným uskutečnit předmětnou redukci, zahrnujícím enzym odvozený z uvedeného mikroorganismu a ko-faktor pro uvedený enzym, a inkubací výsledné směsi za podmínek dostatečných pro získání sloučeniny vzorce II, přičemž pod-

statně více sloučeniny vzorce V zůstává nezreagováno, než sloučeniny vzorce IV a podstatně více sloučeniny vzorce II se vytvoří oproti sloučenině vzorce III.

Jak je známo odborníkům v oboru, sloučenina vzorce I, racemický tetralon, je směs (4S)-tetralonu a (4R)-tetralonu jak je uvedeno níže:

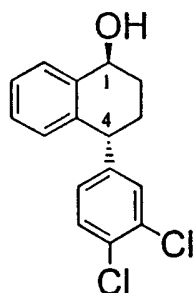


(4S) tetralon

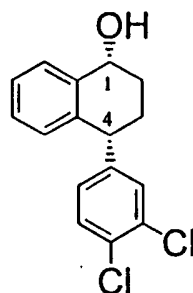


(4R) tetralon

Sloučeniny, nebo specifickěji tetraloly, vzorce II jsou:

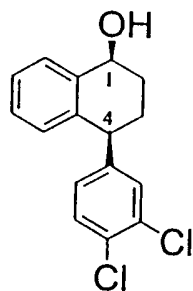


(trans) (1S, 4R)

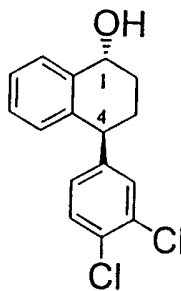


(cis) (1R, 4R)

Sloučeniny, nebo specifičtěji, tetraloly vzorce III jsou:



(cis) (1S, 4S)



(trans) (1R, 4S)

Sloučeniny vzorců II a III jsou zveřejněny a nárokovány v dříve zmíněném US patentu č. 5 750 794.

Požadovaná sloučenina vzorce V může být izolována jak je popsáno dále, od nežádoucích sloučenin vzorce II, a jakýchkoli sloučenin vzorců III nebo IV, které mohou být buď produkovány nebo zůstat nezreagovány v závislosti na, například, vybraném mikroorganismu a podmínkách inkubace.

Sloučeniny vzorce II mohou být převedeny na sloučeninu vzorce I například oxidací a racemizací a proběhnout předmět-nou stereoselektivní mikrobiální redukcí, čímž se získá ještě další množství (4S)-tetralonu vzorce V.

Způsob předloženého vynálezu se snadno provádí. Tak je mikroorganismus buď fermentován (intaktní mikroorganismus) nebo inkubován (přípravek z rozrušených buněk, dehydratovaný přípravek nebo jakýkoli vhodný přípravek z mikroorganismu) v přítomnosti racemického tetralonu představeného vzorcem I, k modifikaci racemického tetralonu a zejména k redukcí

nežádaného (4R)-enantiomeru racemického ketonu na jeho odpovídající alkohol představený vzorcem II, přičemž se nechává požadovaný (4S)-enantiomer představený vzorcem V v podstatě nezreagovaný, čímž v jednom stupni se získá opticky obohacený (4S)-enantiomer.

(4S)-enantiomer může pak být dále reagován způsoby dobře známými odborníkům v odpovídajícím oboru, jak je popsán například v dříve uvedených US patentech č. 4 536 518, 4 777 288, 4 839 104, 4 855 500, 4 940 731, 2 962 128, 5 082 970, 5 130 338, 5 196 607, 5 248 699, 5 442 116, 5 463 126, 5 466 380, 5 597 826 a 5 750 794 a ve výše uvedeném článku W.M.Welcha jr. a j. ke konečnému získání sertralinu.

Aktivita, způsoby pro testování aktivit, dávky, dávkovací formy, způsoby podávání a základní informace týkající se sertralinu jsou uvedeny například ve výše uvedených US patentech č. 4 536 518, 4 777 288 a 4 839 104 a ve výše zmíněném článku W.M.Welcha jr. a j.

Jakýkoli vhodný mikroorganismus může být použit ve způsobu předloženého vynálezu. Jak je popsáno dříve, použitý mikroorganismus v předmětném způsobu může být intaktní, jakýkoli jeho vhodný přípravek, například jeho přípravek z rozrušených buněk, jeho dehydratovaný přípravek a buď volný nebo imobilizovaný. Avšak kde se použije neintaktní mikroorganismus v předloženém vynálezu jako je například přípravek z rozrušených buněk, například buněčný extrakt, acetonový práškový enzymatický přípravek nebo enzym z něj odvozený, odborníci v oboru by měli vědět, že je také zahrnut vhodný kofaktor pro tento enzym.

Odborníci v oboru rozumějí ze zde uvedeného popisu a z jejich odpovídajících znalostí jak připravit vhodný pří-

pravek z rozrušených buněk jak je popsáno například R.N.Patelem a j. v článku "Oxidace sekundárních alkoholů na methylketony kvasinkami", publikovaném v *Applied and Environmental Microbiology*, 38(2):219-223 (1979).

Odborníci v oboru porozumějí z popisu zde uvedeného a jejich odpovídajících vlastností jak připravit vhodný acetonový práškový enzymatický přípravek jak je popsáno například K. Nakamurou a j. v článku "Asymetrická redukce ketonů acetonovým práškem *Geotrichum candidum*", publikovaném v *Tetrahedron Letters*, 37(10):1629-1632 (1996).

Navíc enzym (např. oxidoreduktasa) jakéhokoli vhodného mikroorganismu může být také použit v předmětném způsobu a tento enzym může být izolován z mikroorganismu jakoukoli vhodnou metodou známou odborníkům v oboru a pokud jde o intaktní mikroorganismus, může být použit v předmětném způsobu v buď volné nebo imobilizované formě.

Odborníkům v oboru bude zřejmé z popisu zde uvedeného a jejich odpovídajících znalostí jak izolovat a čistit enzym vhodného mikroorganismu jak je obecně popsáno například v článcích od M.Wady a j. "Čištění a charakterizace NADPH-závislé karbonylreduktasy zahrnuté v stereoselektivní redukci ethyl-4-chlor-3-oxobutanoátu, z *Candida magnoliae*", publikovaném v *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 62(2):280-285 (1998), P.Trosty a j., "Čištění a vlastnosti NAP(P)H: (chinonakceptorové)oxidoreduktasy řepných buněk", publikovaném v *Eur.J.Biochem.*, 234:452-458(1995), K.M.Madyasthy a T.L.Gururaji, "Čištění a některé z vlastností nové sekundární alkoholové dehydrogenasy z *Alcaligenes Eutrophus*", publikovaném v *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 211(2):540-546 (1995), O.Bortoliniho a j., "Kinetické štěpení vic-diolů pomocí *Bacillus stearothermophilus* diacetylreduktasy", publikovaném v *Tetrahedron:Asymmetry*, 9:647-651 (1998), R.M.Patela a j. "Stereo-

specifická mikrobiální redukce 4,5-dihydro-4-(4-methoxyfenyl)-6-(trifluormethyl-1H-1)benzazepin-2-onu", publikovaném v Enzyme Microb. Technol., 3:906-912 (1991) a R.N. Patela a j., "Stereoselektivní mikrobiální/enzymatická oxidace (exo,exo)-7-oxabicyklo[2,2,1]heptan-2,3-dimethanolu na odpovídající chirální laktol a lakton", publikovaném v Enzyme Microb. Technol., 14:778-784 (1992) a v US patentech č. 5 523 223 a výše zmíněném 5 580 764.

Vhodné mikroorganismy zahrnují *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012, *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449, *Absidia coerulea* ATCC č. 20137, *Geotrichum candidum* ATCC č. 34614, *Geotrichum candidum* ATCC č. 62401, *Mortierella isabellina* ATCC č. 42613, *Mortierella isabellina* ATCC č. 38063, *Mortierella vinacea* ATCC č. 09515, *Penicillium notatum* ATCC č. 36740, *Blastoschizomyces capitatus* ATCC č. 28575, *Monosporium olivaceum* v. *major* ATCC č. 36300, *Aureobasidium pullulans* ATCC č. 16623, *Debaryomyces polymorphus* ATCC č. 20280, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC č. 15248, *Candida schatavii* ATCC č. 24409, *Pichia fabianii* ATCC č. 16755 a *Streptomyces rimosus* ss. *rimosus* ATCC č. 10970, a jejich mutanty, které jsou známy nebo jinak získatelné odborníky v odpovídajícím oboru a jsou schopné, navzdory takovéto mutaci, uskutečnit stereoselektivní mikrobiální redukci zde uvedenou.

Výhodné intaktní mikroorganismy budou ty, které podstatně redukuje (4R)-tetralon, přičemž nechávají (4S)-tetralon v podstatě nezreagovaný, kde zreagovaný zahrnuje redukci nebo jakoukoli jinou vlastní aktivitu, která by mohla degradovat nebo jinak negativně ovlivnit požadovaný (4S)-tetralon v jakémkoli stadiu předmětného způsobu.

Jak bude oceněno odborníky v oboru, z uvedeného popisu takováto nežádaná reakce (4S)-tetralonu může být v podstatě

zabráněna například použitím enzymu odvozeného z vybraného mikroorganismu oproti intaktnímu mikroorganismu.

Mikroorganismy vhodné pro použití při předemtné stereospecifické mikrobiální redukci mohou být připraveny jakýmkoli vhodným způsobem známým odborníkům v odpovídajícím oboru.

Například vhodným způsobem pro přípravu mikroorganismu z komerčně dostupného původu je uveden dále. Způsob vytvořený dále může být použit pro jakýkoli mikroorganismus vhodný pro použití při předloženém způsobu tohoto vynálezu a odborníci v oboru by měli ze zde uvedeného popisu vědět, jak modifikovat jakoukoli část postupu, například metody přípravy mikroorganismu, intaktního nebo přípravku, například rozrušených buněk nebo dehydratovaného, volného nebo imobilizovaného, způsobu přípravy vhodného enzymu odvozeného z takového mikroorganismu, způsobu kontaktu racemického tetralonu s mikroorganismem nebo enzymem obsahujícím enzymový redukční systém z něj odvozený, komponenty růstového media a podmínky, například teplotu, pH a podobně, nebo inkubační podmínky, aby se dosáhlo požadovaného výsledku v kterémkoli příslušném postupu.

Odborníci v oboru budou vědět z popisu, který je zde uveden a z jejich odpovídajících znalostí, jak připravit vhodný imobilizovaný intaktní mikroorganismus jak je popsán například A. Bauerem a j. v článku "Polyvinylalkoholem imobilizované celobuněčné přípravky pro biotransformaci nitrilů" publikovaném v *Biotechnology Letters*, 18(3): 343-348 (březen 1996).

Jakákoli vhodná metoda styku sloučeniny I s mikroorganismem nebo enzymovým redukčním systémem může být použita v tomto vynálezu. Sloučenina vzorce I může být kontaktována

s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem v jakémkoli vhodném pořádku.

Například sloučenina vzorce I může být přidána do media jako je kultivační bujón obsahující mikroorganismus volný nebo imobilizovaný nebo určitou jeho kombinaci, nebo medium může obsahovat sloučeninu vzorce I a mikroorganismus může pak být přidán do tohoto media, nebo sloučenina vzorce I a mikroorganismus mohou být přidány společně do takového media, nebo sloučenina vzorce I může být přidána do přípravku z jeho rozrušených buněk, nebo sloučenina vzorce I může být přidána do dehydratovaného přípravku mikroorganismu, nebo buď sloučenina vzorce I nebo mikroorganismus nebo enzymový redukční systém mohou být přidány do vhodného rozpouštědla obsahujícího ty druhé a podobně. Odborníkům v oboru bude jasné ze zde uvedeného popisu jak modifikovat jakoukoli část předmětného způsobu, pokud je to třeba.

Je zvlášť výhodné předloženém vynálezu, že mikroorganismus nebo enzymový redukční systém je odvozen z Hansenula polymorpha ATCC č. 26012. Lyofilizovaný vzorek Hansenula polymorpha ATCC č. 26012 (původně přispěním od D.W.Levina) byl uložen s ATCC lokalizovaným jako 10801 v University Boulevard Manassas, Virginia, 20110-2209, USA za podmínek Budapeštské smlouvy 26. června 1998. Této nově uložené kultuře bylo dáno nové depozitní číslo ATCC č. 74449.

Tudíž je zvlášť výhodné v předloženém vynálezu, že mikroorganizmem je Hansenula polymorpha ATCC č. 74449. Všechny restriktce na dostupnost veřejnosti této kultury mikroorganismu takto uložené budou neodvolatelně odstraněny po vydání patentu na přihlášku tohoto vynálezu.

Kultury *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 mohou být získány z ATCC a příklad vhodného způsobu pro jejich přípravu z komerčně nabytého výrobku je uveden bezprostředně dále. Kultura takto získaná se přidá do vhodného růstového media a inkubuje se za třepání až nastane růst, kteréžto dva stupně jsou oceněny odborníky v oboru. Kultura takto připravená může být použita k inokulaci šikmin s částmi těchto šikmin zmrazenými jako základní zásoby. Alternativně kapalně zásobní kultury mohou být připraveny přidáním glycerolu na asi 10 % až asi 20 %, které jsou pak zmrazeny na asi -30°C , výhodně v malých kryozkumavkách.

Jak vědí odborníci v oboru, jakýkoli vybraný organizmus a jak je zde vytvořeno dále v příkladech pro *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 a zejména výhodný *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 nebo ATCC č. 74449, vhodná metoda pro přípravu mikroorganismu je následující: mikroorganismus se inokuluje ze zmrazené zásobní kultury jak je popsáno výše (asi 17%ní glycerolová zásoba) do baňky nebo skleněné zkumavky nebo s kovovým uzávěrem, obsahující růstové medium (obsahující alikvot ze sterilního roztoku, který zahrnuje Tween 80, glycerol a destilovanou vodu), kterážto kompozice je popsána dále detailněji.

Fermentace se provádí při teplotách v rozmezí asi 22°C až asi 32°C a výhodně při asi 29°C za vhodného třepání, výhodně od asi 200 otáček za minutu do asi 220 otáček za minutu a nejvýhodněji při asi 210 otáčkách za minutu. Kde je to žádáno, pH růstového media může být udržováno použitím vhodných pufrů začleněných do fermentačního media a/nebo periodicky nastavováno přidávkem buď báze nebo kyseliny jak je třeba.

Jakékoli vhodné trvání růstu mikroorganismu, styk mikroorganismu se sloučeninou vzorce I a inkubace sloučeniny

vzorci I s mikroorganizmem mohou být použity v předloženém vynálezu. Vhodný růst mikroorganismů se může dosáhnout například během 24 hodin, v kteréžto době vhodný alikvot roztoku racemického tetralonu ve vhodném rozpouštědle, výhodně ethanolu, může být přidán do kultury.

Fermentace pak může pokračovat například od asi 2 do asi 6 dnů a výhodně například po dobu asi 5 dnů, v kteréžto době může být fermentační bujón extrahován pomocí vhodné extrakční metody při níž vhodné rozpouštědlo, jako je například ethylacetat, methylisobutylketon, methylethylketon, methylenchlorid a podobně, výhodně ethylacetat, odstraní organické sloučeniny z fermentačního bujónu. Po extrakci fermentačního bujónu a separaci organické a vodné fáze mohou být sloučeniny obsahující organický zbytek určeny pomocí vhodné metody jako je například chromatografie, výhodně chirální HPLC.

Ve způsobu tohoto vynálezu může být použito jakékoli vhodné růstové médium a vhodné růstové médium bude obsahovat zdroj nebo zdroje asimilovatelného uhlíku, asimilovatelného dusíku a anorganické soli obsahující esenciální minerály.

Obecně mnoho cukrů jako je například glukosa, maltosa, mannososa, sacharosa, škrob, glycerin, prosné želé, melasy, sojové oříšky a podobně, může být použito jako zdroje asimilovatelného uhlíku.

Zdroje asimilovatelného dusíku zahrnují například látky, jako jsou kvasnice a kaseinové hydrolyzáty, primární kvasnice, kvasnicové extrakty, mouka z bavlníkových semen, tuhé látky ze sojových oříšků, pšeničné klíčky, masové extrakty, pepton, kukuřičný výluh a amonné soli.

Vhodné nutriční látky z anorganických solí pro použití v kultivačním mediu tohoto vynálezu zahrnují například běžné soli obsahující sodík, železo, hořčík, draslík, kobalt, fosforečnan a podobně.

Zejména růstová media vhodná pro použití v předloženém vynálezu zahrnují například

(a) dextrosu (asi 20 g), kvasnicový extrakt (asi 5 g), sojovou mouku (asi 5 g), NaCl (asi 5 g), K_2HPO_4 (asi 5 g) a destilovanou vodu (asi 1 l), pH se nastaví na asi 7,0 pomocí vodného roztoku H_2SO_4 ,

(b) dextrin (asi 10 g), hovězí extrakt (asi 3 g), ardamín pH (asi 5 g), NZ amin typ E (asi 5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (asi 0,5 g), KH_2PO_4 (asi 0,37 g), $CaCO_3$ (asi 0,5 g) a destilovanou vodu (asi 1 l), pH se nastaví na asi pH 7,1 pomocí vodného roztoku HCl, načež následuje druhé stadium z glukosy (asi 10 g), Hy-Case SF (asi 2 g), hovězího extraktu (asi 1 g), výluh z kukuřičných stvolů (asi 3 g), a destilované vody (asi 1 l), pH se nastaví na asi pH 7,0,

(c) glukosu (asi 10 g), kukuřičný výluh (asi 6 g), KH_2PO_4 (3 g), $CaCO_3$ (3,5 g), sojový olej (surový, asi 2,2 ml), kvasnicového extraktu (asi 2,5 g) a destilované vody (asi 1 l), pH se nastaví od asi 7,0 do asi 7,3 pomocí vodného roztoku HCl

(d) sladový sirup (asi 20 g), sojovou mouku (asi 5 g), kasein (asi 1 g), sušené kvasnice (asi 1 g), NaCl (asi 5 g) a destilovanou vodu (asi 1 l),

(e) laktosu (asi 75 g), Pharmamedia (nahrazuje kvasnicový extrakt (asi 40 g), $CaCO_3$ (asi 10 g), Na_2SO_4 (asi 4 g) a destilovanou vodu (asi 1 l),

(f) ISP č. 2 (viz například strana 460 Handbook of Microbial Media od R.M.Atlase, vydaná L.C.Parksem, CRC Press, Inc., 1993 (Handbook)),

(g) ISP č. 3 (viz str. 460 Handbook),

(h) ISP č. 4 (viz str. 461 Handbook),

(i) ISP č. 5 (viz str. 461-462 Handbook) a podobně.

Zvlášť výhodné růstové medium je 2krát (a) uvedené výše.

Odkaz na jednotlivé pufry, media, reagenty, styk nebo podmínky kultivace a podobně není určen k omezení, ale je třeba ho číst tak, že zahrnuje všechny takovéto příslušné látky, které odborníci v oboru znají jako zajímavé nebo hodnotné v příslušném kontextu, ve kterém se zde provádí diskuze. Například je možné substituovat jeden pufrový systém nebo kultivační medium za jiné, takže rozdílné, ale známé způsoby se použijí k dosažení stejných cílů jako jsou ty, ke kterým se používá navrhované metody materiálu nebo složení. Navíc by mělo být zřejmé, že předložený vynález zahrnuje zvětšení předmětného postupu pro komerční účely.

Tudíž jak vědí odborníci v oboru, růstové medium, podmínky fermentace a/nebo množství racemického tetralonu, mohou být měněny k řízení výtěžku výsledných sloučenin a jejich relativních rychlostí produkce.

Obecně použité technologie v předloženém vynálezu budou zvoleny s ohledem na průmyslovou účinnost. Růstová media, podmínky fermentace a relativní množství mikroorganismu nebo enzymového redukčního systému a racemického tetralonu, které

jsou zde popsány, jsou pouze ilustrativní ze široké palety medií, fermentačních podmínek a množství výchozích látek, které mohou být vhodně využity v předloženém vynálezu jak je zřejmé odborníkům v oboru, a nejsou určeny k jakýmkoli způsobem k omezení.

Jakékoli vhodné metody izolace a/nebo čištění, kterýchkoli produktů předloženého způsobu mohou být použity v předloženém vynálezu včetně filtrace, extrakce, krystalizace, sloupcové chromatografie, tenkovrstvé chromatografie, preparativní nízkotlaké kapalinové chromatografie nebo HPLC, nebo jakékoli vhodné kombinace těchto metod.

Dále odborníkovi z oboru je zřejmé, že nežádáný odpovídající alkohol z (4R)-tetralonu, sloučenina vzorce II, produkováný zde uvedenými postupy, může být recyklován, například oxidován a racemizován jak bylo dříve diskutováno, jakoukoli známou vhodnou metodou na racemický tetralon vzorce I a postupy předloženého vynálezu mohou být opakovány, aby vedly znovu k požadovanému (4S)-tetralonu vzorce V. Oxidace (4R)-tetralolu na (4R)-keton může být provedena způsoby známými odborníkům v oboru.

Racemizační reakce se může provádět jakýmkoli vhodným způsobem, ale obecně se provádí při teplotě od asi 0 °C do asi 100 °C, výhodně od asi 25 °C do asi 65 °C. (4R)-Tetralon se nechá reagovat s bází při teplotě od asi 25 °C do asi 85 °C, výhodně od asi 50 °C do asi 65 °C. Vhodné báze pro racemizační reakci zahrnují t-butoxid draselný, hydroxid sodný, methoxid sodný a hydroxid draselný. Výhodná báze je t-butoxid draselný.

Detailní příklady uvedené dále, ukazují, že řada mikroorganismů zahrnující houby, například kvasinky a aktinomycety,

stereoselektivně redukuje racemický tetralon, čímž se získá požadovaný (4S)-tetralon vzorce V, to je chirální tetralon, který pak může být separován z nežádoucích sloučenin a dále reagován postupy dobře známými v dosavadním stavu techniky pro získání sertralinu.

Příklady provedení vynálezu

Předložený vynález je ilustrován následujícími příklady provedení. Předcházející a následující popis předloženého vynálezu a různá provedení nejsou určeny k omezení vynálezu, ale pouze jsou jeho ilustrací. Tudiž je třeba rozumět, že vynález není omezen na specifické detaily těchto příkladů.

Příklad I

Redukce racemického tetralonu pomocí *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012

A. Fermentace kvasinek *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012

Jedna "kontrolní" kultura (Cl) a jedna "zkušební" kultura (Tl) byly připraveny následovně: asi 2,5 ml sterilního růstového media (asi 40 g/l dextrosy, asi 10 g/l nutrisojové mouky, asi 10 g/l kvasnicového extraktu, asi 10 g/l NaCl a asi 10 g/l K_2HPO_4 , s pH nastaveným na asi 7,0 pomocí H_2SO_4) bylo přidáno do každé ze dvou 16 x 125 mm skleněných zkumavek, z nichž každá měla kovový uzávěr (Cl, Tl) načež následoval přídatek asi 0,2 ml roztoku A (asi 25 g Tween 80, asi 100 g glycerolu a asi 250 ml destilované vody, filtračně sterilizované) do každé ze dvou kultur.

Asi 25 mikrolitrů asi 17%ní zmrazené glycerolové zásoby *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 bylo inokulováno do Tl. Tyto dvě zkumavkové kultury byly inkubovány při asi 29 ° za třepání při asi 210 otáčkách za minutu. Po 24 hodinách asi 50 mikrolitrů zásobního roztoku (asi 5 mg/ml v asi 100%ním ethanolu, finální koncentrace asi 100 mikrogramů/ml) racemického tetralonu (sloučenina vzorce I obsahující sloučeniny vzorců IV a V, v asi 5 mg/ml v ethanolu) bylo přidáno do Cl a Tl.

Po asi 5 dnech byl 1 ml nasyceného roztoku NaCl přidán do každé ze dvou zkumavkových kultur. Fermentační bujón z každé zkumavkové kultury (asi 3,6 ml) byl extrahován stejným objemem ethylacetatu (nezředěného): ethylacetat byl přidán, zkumavková kultura byla rozvířena a pak odstředěna při asi 2000 otáčkách za minutu (IEC Centrifuge, 300 Second Avenue, Needham Heights, Massachusetts, 02194). Ethylacetatová vrstva byla odstraněna a vodná vrstva extrahována po druhé. Sloučené organické extrakty byly vysušeny pod atmosférou dusíku ve vodní lázni při asi 50 °C.

B. Konfigurace zbytkového ketonu: sloučeniny vzorců IV a V

Každý z extraktů připravených jak je výše popsáno, byl resuspendován v asi 1 ml ethanolu a asi 20 mikrolitrů každého resuspendovaného extraktu bylo analyzováno injekcí na HPLC sloupec: Chiralcel OK ochranná kolona (4,6 x 50 mm, Diacel Chemical Industries, Ltd., 730, Springdale, Drive, PO box 564, Exton, Pennsylvania 19341) připojená k Chiralcel OK koloně (4,6 x 250 mm, Diacel). Sloučeniny obsažené v každém injektovaném resuspendovaném extraktu byly odděleny isokraticky v asi 0,8 ml za minutu v mobilní fázi (ethanol:ethylacetat 85:15) a sloučeniny zahrnující extrakty byly detekovány pomocí 996 PDA detektoru (Waters, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts, 01757) seřizovaného při 254 nm.

Jak je znázorněno údaji pro C1 a T1 v následující tabulce I, chirální HPLC analýza ukazuje, že začleněné mikroorganismu, to je *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 vede k poměru 16:1 ((4S)-tetralon vzorce V nezreagovaný oproti (4R)-tetralon vzorce IV nezreagovaný), což dále ilustruje stereospecifitu předmětného mikrobiálního redukčního postupu. Dále uvedené výsledky jsou založeny na známém množství každého přidaného enantiomeru (asi 50 mikrogramů/ml každé ze sloučenin vzorců IV a V). Jak je zmíněno výše, výchozí racemický tetralon vzorce I má koncentraci asi 100 mikrogramů/ml.

Tabulka I

Kultura	(4S)-tetralon ($\mu\text{g/ml}$)	(4R)-tetralon ($\mu\text{g/ml}$)	4S:4R
C1	42,63	43,04	1
T1	37,92	2,37	16

Výsledky z chirální analýzy ukazují, že *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 kultura (T1) podstatně snižuje (4R)-tetralon, přičemž ponechává v podstatě nezreagovaný (4S)-tetralon (asi 4,7 % (4R)-tetralonu zůstává oproti asi 76 % (4S)-tetralonu). (4S)-Tetralon byl určen, že je přítomen v asi 88%ním ee ("procentní množství enantiomerního přebytku") touto chirální HPLC. Jak je také znázorněno údaji v tabulce I, specificky poměrem (4S):(4R), to je 16, podstatně více (4S)-tetralonu zůstává nezreagováno oproti (4R)-tetralonu.

V souhlase s tím začlenění intaktního mikroorganismu to je *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 vede ke stereospeci-

fické redukci podstatně více výchozího (4R)-tetralonu vzorce IV než výchozího (4S)-tetralonu vzorce V ((4S):(4R), a získá se většinou (4R)-tetralol vzorce II oproti (4S)-tetralolu vzorce III (údaje nejsou uvedeny)). Většina (4R)-tetralolu, který byl získán, byla (1S,4R)-tetralol a většina malého množství (4S)-tetralolu, který byl získán, byla (1S,4S)-tetralol.

Příklad II

Redukce racemického tetralonu za použití *Absidia coerulea* ATCC č. 20137

A. Fermentace houby *Absidia coerulea* ATCC č. 20137

Jedna "kontrolní" kultura (C2) a jedna "zkušební kultura" (T2) byly připraveny následovně: asi 2,5 ml sterilního růstového media (asi 2 g/l dextrosy, asi 5 g/l nutrisojové mouky, asi 5 g/l kvasnicového extraktu, asi 5 g/l NaCl a asi 5g/l K_2HPO_4 , s pH nastaveným na asi 7,0 pomocí H_2SO_4) byly přidány do každé ze dvou 16 x 125 mm skleněných zkumavek, přičemž každá měla kovový uzávěr (C2,T2).

Asi 25 mikrolitrů asi 17%ní zmrazené glycerolové zásoby *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 bylo inokulováno do T2. Tyto dvě zkumavkové kultury byly inkubovány při asi 29 °C za třepání při asi 210 otáčkách za minutu. Po asi 48 hodinách asi 50 mikrolitrů (asi 5 mg/ml v ethanolu, finální koncentrace asi 100 mikrog/ml) racemického tetralonu (jak je popsáno v příkladu I, při asi 5 mg/ml v asi 100%ním ethanolu bylo přidáno do C2 a T2.

Po asi 5 dnech byl přidán 1 ml nasyceného roztoku NaCl do každé z těchto dvou zkumavkových kultur.

Fermentační bujón každé zkumavkové kultury (asi 3,6 ml) byl extrahován asi 3 ml ethylacetatu (nezředěného): byl přidán ethylacetat, zkumavková kultura byla rozvířena a pak odstředěna při asi 2000 otáčkách za minutu (IEC Centrifuge). Ethylacetatová vrstva byla odstraněna a vodná vrstva byla extrahována podruhé. Sloučené organické extrakty byly vysušeny pod atmosférou dusíku ve vodní lázni při asi 50 °C.

B. Konfigurace zbylého ketonu: sloučeniny vzorce IV a V

Každý z extraktů, připravených jak je výše popsáno, byl resuspendován v asi 1 ml ethanolu a asi 20 mikrolitrů každého resuspendovaného extraktu bylo analyzováno vstříknutím na HPLC sloupec: Chiralcel OK ochranná kolona (4,6 x 50 mm, spojená s Chiralcel OK kolonou (4,6 x 250 mm). Sloučeniny obsažené v každém vstříknutém resuspendovaném extraktu byly separovány isokraticky při asi 0,8 ml za minutu v mobilní fázi (ethanol:ethylacetat, 85:15) a tyto sloučeniny obsahující extrakty byly detekovány pomocí 996 PDA detektoru (Waters) seřazeného při 254 nm.

Jak je znázorněno HPLC údaji pro C2 a T2 uvedenými níže, začlenění mikroorganismu, to je *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 vedlo ke stereospecifické redukci více výchozího (4R)-tetralonu vzorce IV než výchozího (4S)-tetralonu vzorce V.

Specifičtěji výsledky z chirální analýzy ukazují, že *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 kultura snižuje (4R)-tetralon přičemž nechává v podstatě nezreagovaný (4S)-tetralon (asi 13,6 % (4R)-tetralonu zůstává oproti asi 40,5 % (4S)-tetralonu) (4S)-tetralon byl určen, že je přítomen v asi 50%ní ee touto chirální HPLC.

Jak je znázorněno údaji pro C2 a T2 z tabulky II, která

následuje, chirální HPLC analýza ukazuje, že začlenění mikroorganismu, to je *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 (T2), vede k poměru alespoň dvojnásobnému pokud jde o (4S)-tetralon poněkud nezreagovaný oproti nezreagovanému (4R)-tetralonu, přičemž je dále zřejmá stereospecifita předmětného mikrobiálního redukčního postupu.

Dále uvedené výsledky jsou založeny na známém množství každého přidaného enantiomeru (asi 50 mikrogramů/ml každého jak je popsáno zde v příkladu I). Jak je výše zmíněno, výchozí racemický tetralon měl koncentraci asi 100 mikrogramů/ml.

Tabulka II

kultura	(4S)-tetralon ($\mu\text{g/ml}$)	(4R)-tetralon ($\mu\text{g/ml}$)	4S:4R
C2	39,53	39,47	1
T2	20,24	6,81	3

Příklad III

Redukce racemického tetralonu za použití hub, kvasinek a aktinomycet

Jak je porozuměno odborníkům v odpovídajícím oboru, mikroorganismy uvedené v tabulce III, které byly použity v předmětné redukci, *Geotrichum candidum* ATCC č. 62401, *Mortierella isabellina* ATCC č. 38063, *Mortierella vinacea* ATCC

č. 09515, *Penicillium notatum* ATCC č. 36740, *Blastoschizomyces capitatus* ATCC č. 28575, *Monosporium olivaceum* v.major ATCC č. 36300, *Aureobasidium pullulans* ATCC č. 16623, *Pichia fabiani* ATCC č. 16755 a *Streptomyces rimosus* ss. *rimosus* ATCC č. 10970 byly připraveny jak je popsáno v příkladu II, *Geotrichum candidum* ATCC č. 34614, *Mortierella isabellina* ATCC č. 42613, *Debaryomyces polymorphus* ATCC č. 20280 a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC č. 15248 byly připraveny jak je popsáno v příkladu II s výjimkou toho, že extrakce byla opakována a *Candida schatavii* ATCC 24409 byly připraveny jak je uvedeno dále.

Candida schatavii ATCC č. 24409 byla připravena a použita podle tohoto vynálezu následovně: asi 2,5 ml sterilního růstového media (asi 20 g/l dextrosy, asi 5 g/l nutrisojové mouky, asi 5 g/l kvasnicového extraktu, asi 5 g/l NaCl a asi 5 g/l K_2HPO_4 , s pH nastaveným na asi 7,0 pomocí H_2SO_4) bylo přidáno do 16 x 125 mm skleněné zkumavky mající kovový uzávěr, načež následoval přídavek asi 0,1 ml filtračně sterilizovaného roztoku asi 25 g Tween 80, asi 100 g glycerolu a asi 250 ml destilované vody do kultury.

Dále asi 25 mikrolitrů asi 17%ní zmrazené glycerolové zásoby *Candida schatavii* ATCC č. 24409 bylo inokulováno do kultury. Kultura byla pěstována při asi 29 °C za třepání při asi 210 otáčkách za minutu. Po asi 48 hodinách asi 50 mikrolitrů zásobního roztoku (asi 5 mg/ml v asi 100%ním ethanolu, finální koncentrace asi 100 mikrogramů/ml) racemického tetralonu (sloučenina vzorce I obsahující sloučeniny vzorců IV a V, v asi 5 mg/ml v asi 100%ním ethanolu) bylo přidáno do kultury.

Po dalších 4 dnech byl fermentační bujón kultury (asi 2,6 ml) extrahován stejným objemem ethylacetatu (nezředěného), kultura byla rozvířena a pak odstředěna při asi 2000 otáčkách za minutu (IEC Centrifuge).

Extrakce byla opakována. Extrakty byly vysušeny po dusíkem ve vodní lázni při asi 50 °C. Extrakty pak byly resuspendovány v asi 1 ml ethanolu a asi 5 mikrol resuspendovaného extraktu bylo analyzováno vstříkem na HPLDC sloupec: Chiralcel OD ochranná kolona (4,6 x 50 mm, Diacel Chemical Industries, Ltd.) připojená na Chiralcel OD kolonu (4,6 x 250 mm, Diacel). Obsažené sloučeniny v injektovaném resuspendovaném extraktu byly odděleny isokraticky při asi 0,9 ml za minutu v mobilní fázi (hexan:isopropanol, 95:5) a sloučeniny obsahující extrakt byly dokázány pomocí 996 PDA detektoru (Waters) seřizovaném při 210 nm.

Jak se ukázalo při chirální HPLC (prováděné jako v příkladu I a II), údaje uvedené v tabulce III, každý z uvedených mikroorganismů v tabulce III stereospecificky redukoval více (4R)-tetralonu než (4S)-tetralonu a to vedlo obecně k poměru alespoň dvojnásobnému, pokud jde o (4S)-tetralon ponechaný nezreagovaný oproti nezreagovanému (4R)-tetralonu.

Tabulka III

Kultura ATCC č., typ organismu	2S-tetra- lon (µg/ml)	4R-tetra- lon (µg/ml)	4S:4R
<i>Geotrichum candidum</i> -1 34614, houba	18,23	7,85	2,32
<i>Geotrichum candidum</i> -2 62401, houba	12,16	6,17	1,97
<i>Mortierella isabellina</i> -1 42613, houba	3,33	1,36	2,45
<i>Mortierella isabellina</i> -2 38063, houba	2,74	0,95	2,88
<i>Mortierella vinacea</i> 09515, houba	6,01	1,45	4,14
<i>Penicillium notatum</i> 36740, houba	10,39	5,50	1,89
<i>Blastoschizomyces capitatus</i> 28575, houba	9,47	4,5	2,10
<i>Monosporium olivaceum</i> v.major 36300, houba	10,39	0,71	14,6
<i>Aureobasidium pullulans</i> 16623, houba	11,76	3,65	3,22
<i>Debaryomyces polymorphus</i> 20280, kvasinka	7,18	3,67	1,96
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15248, kvasinka	24,33	14,42	1,69
<i>Candida schatavii</i> 24409, kvasinka	7,18	1,03	6,97
<i>Pichia fabianii</i> 16755, kvasinka	17,89	8,97	1,99
<i>Streptomyces rimosus</i> ss. <i>rimosus</i> , 16755, aktinomyceta	3,21	1,68	1,91

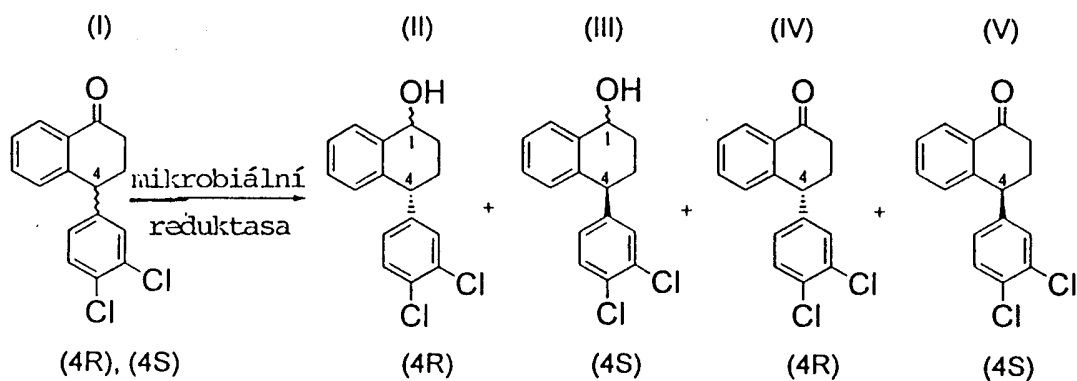
00.11.99

- 32 -

Je třeba poznamenat, že zatímco intaktní *Monosporium olivaceum* v. major ATCC č. 36300 jak je znázorněno údaji v tabulce III, redukoval podstatně více (4R)-tetralonu oproti (4S)-tetralonu a tak by mohl být preferovaným organismem pro použití v předmětném postupu, nicméně nežádoucí degradace jako (4R)-tetralonu, tak (4S)-tetralonu byla také zaznamenána pro tuto kulturu. Nežádoucí degradace může být vlivem například jiných enzymů a podobně obsažených v intaktním mikroorganismu. Tudiž odborníci v oboru ze zde uvedeného popisu vědí, že je výhodné použít enzymu izolovaného z *Monosporium olivaceum* v. major ATCC č. 36300 oproti intaktnímu *Monosporium olivaceum* v. major ATCC č. 36300.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob stereoselektivní mikrobiální redukce sloučeniny vzorce I na sloučeniny vzorců II a III



vyznačený tím, že se sloučenina vzorce I uvede do styku s mikroorganizmem nebo enzymovým redukčním systémem schopným uskutečnit tuto redukci obsahujícím enzym odvozený od uvedeného mikroorganismu a kofaktor pro tento enzym a

výsledná směs se inkubuje za podmínek dostatečných pro získání většího množství sloučeniny vzorce II než sloučeniny vzorce III, čímž se ponechá větší množství sloučeniny vzorce V nezreagované než nezreagované sloučeniny vzorce IV, přičemž uvedený mikroorganismus se vybere ze skupiny zahrnující *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012, *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449, *Absidia coerulea* ATCC č. 20137, *Geotrichum candidum* ATCC č. 34614, *Geotrichum candidum* ATCC č. 62401, *Mortierella isabellina* ATCC č. 42613, *Mortierella isabellina* ATCC č. 38063, *Mortierella vinacea* ATCC č. 09515, *Penicillium notatum* ATCC

č. 36740, *Blastoschizomyces capitatus* ATCC č. 28575, *Monosporium olivaceum* v. *major* ATCC č. 36300, *Aureobasidium pullulans* ATCC č. 16623, *Debaryomyces polymorphus* ATCC č. 20280, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC č. 15248, *Candida schatavii* ATCC č. 24409, *Pichia fabianii* ATCC č. 16755 a *Streptomyces rimosus* ss. *rimosus* ATCC č. 10970, a jejich mutanty schopné provést uvedenou redukci.

2. Způsob podle nároku 1 vyznačený tím, že sloučenina vzorce V se oddělí od sloučenin vzorců II, III a IV.
3. Způsob podle nároku 2 vyznačený tím, že uvedené oddělení se provede pomocí chromatografie.
4. Způsob podle nároku 2 vyznačený tím, že oddělení se provede pomocí krystalizace.
5. Způsob podle nároku 2 vyznačený tím, že sloučenina vzorce II se oddělí od sloučenin vzorců III a IV.
6. Způsob podle nároku 5 vyznačený tím, že oddělená sloučenina vzorce II se recykluje na sloučeninu vzorce I oxidací této oddělené sloučeniny vzorce II a racemizací oxidované sloučeniny na sloučeninu vzorce I.
7. Způsob podle nároku 6 vyznačený tím, že uvedená racemizace zahrnuje reakci oxidované sloučeniny s bází.
8. Způsob podle nároku 1 vyznačený tím, že sloučenina vzorce I se připraví jak je definováno v nároku 6.
9. Způsob podle nároku 1 vyznačený tím, že uvedený styk se provede s uvedeným mikroorganizmem.

10. Způsob podle nároku 1 vyznačený tím, že uvedený styk se provede s enzymovým redukčním systémem.
11. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že uvedený mikroorganismus je intaktní mikroorganismus.
12. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že uvedeným mikroorganismem je přípravek z jeho rozrušených buněk.
13. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že mikroorganismem je jeho dehydratovaný přípravek.
14. Způsob podle nároku 11 vyznačený tím, že uvedený intaktní mikroorganismus zahrnuje promyté buňky uvedeného intaktního mikroorganismu.
15. Způsob podle nároku 14 vyznačený tím, že uvedené promyté buňky jsou imobilizovány.
16. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že enzym uvedeného enzymového redukčního systému je imobilizován.
17. Způsob podle nároku 13 vyznačený tím, že dehydratovaný přípravek je acetonový práškový enzymatický přípravek.
18. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že uvedený mikroorganismus je v kultivačním bujónu.
19. Způsob podle nároku 18 vyznačený tím, že uvedený styk se provede přidáním sloučeniny vzorce I do kultivačního bujónu.
20. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že enzymový redukční systém je v rozpouštědle.
21. Způsob podle nároku 20 vyznačený tím, že uvedené

rozpouštědlo je výhodně organické rozpouštědlo.

22. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že uvedený styk se provede přidáním sloučeniny vzorce I do tohoto rozpouštědla.

23. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že mikroorganizmem je *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 nebo *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449 nebo jejich mutanty.

24. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že enzym zahrnující uvedený enzymový redukční systém je odvozen z *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 nebo *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449, nebo jejich mutantů.

25. Způsob podle nároku 18 vyznačený tím, že mikroorganizmem je *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 nebo *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449 nebo jejich mutanty.

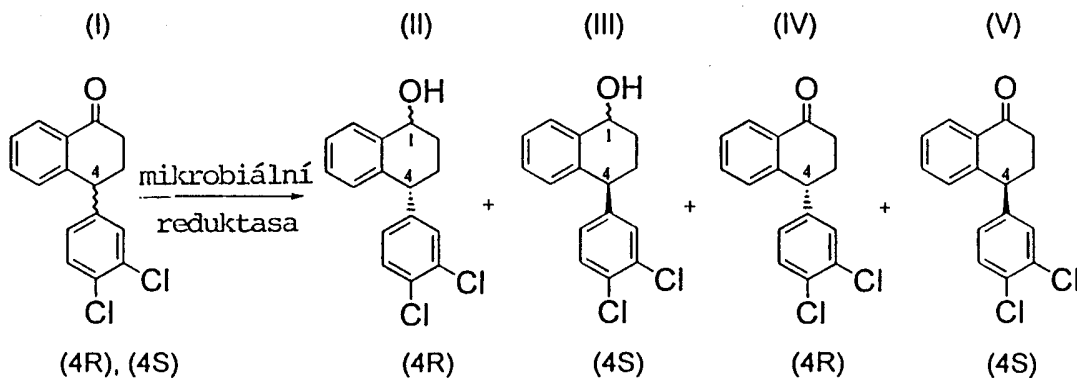
26. Způsob podle nároku 19 vyznačený tím, že mikroorganizmem je *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012 nebo *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449, nebo jejich mutanty.

27. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že mikroorganizmem je *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 nebo jeho mutanty.

28. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že enzym zahrnující enzymový redukční systém je odvozen z *Absidia coerulea* ATCC č. 20137 nebo jeho mutantů.

29. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že enzym zahrnující uvedený enzymový redukční systém je odvozen z *Monosporium olivaceum* v. major ATCC č. 36300 nebo jeho mutantů.

30. Způsob stereoselektivní mikrobiální redukce sloučeniny vzorce I na sloučeniny vzorců II a III

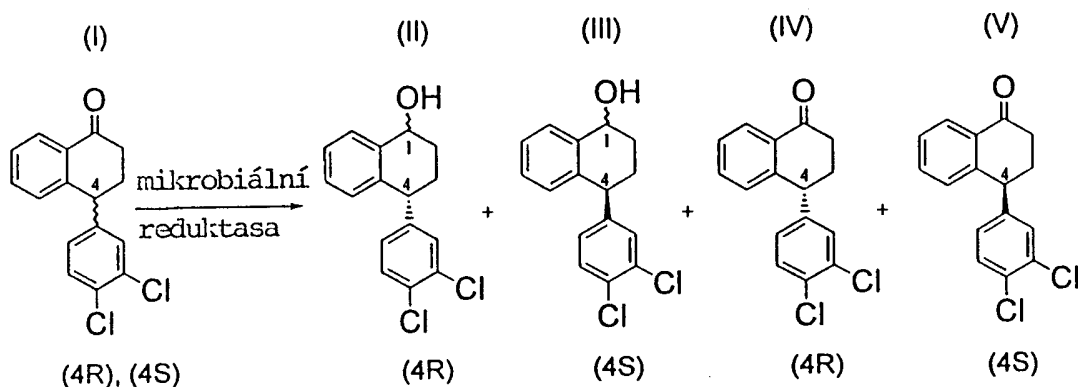


vyznačený tím, že zahrnuje styk sloučeniny vzorce I s mikroorganizmem a inkubaci výsledné směsi za podmínek dostatečných k získání více sloučeniny vzorce II než sloučeniny vzorce III, čímž se nechá více sloučeniny vzorce V nezreagované než sloučeniny vzorce IV, přičemž uvedený mikroorganismus se vybere ze skupiny zahrnující *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012, *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449 a jejich mutanty schopné provést uvedenou redukci.

31. Způsob podle nároku 30 vyznačený tím, že mikroorganismus je v kultivačním bujónu.

32. Způsob podle nároku 31 vyznačený tím, že uvedený styk se provede přidáním sloučeniny vzorce I do kultivačního bujónu.

33. Způsob stereoselektivní mikrobiální redukce sloučeniny vzorce I na sloučeniny vzorců II a III



vyznačený tím, že se sloučenina vzorce I uvede do styku s enzymovým redukčním systémem schopným provést uvedenou redukci, zahrnujícím enzym odvozený z mikroorganismu a kofaktor pro uvedený enzym a výsledná směs se inkubuje za podmínek dostatečných k dosažení většího výtěžku sloučeniny vzorce II než sloučeniny vzorce III, čímž se zanechá více sloučeniny vzorce V nezreagované než sloučeniny vzorce IV, přičemž uvedený mikroorganismus se vybere ze skupiny zahrnující *Hansenula polymorpha* ATCC č. 26012, *Hansenula polymorpha* ATCC č. 74449 a jejich mutanty schopné provést uvedenou redukci.

34. Způsob podle nároku 33 vyznačený tím, že enzymový redukční systém je v rozpouštědle.

35. Způsob podle nároku 34 vyznačený tím, že styk se provede přidáním sloučeniny vzorce I do tohoto rozpouštědla.

Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš