

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505618

(P2004-505618A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 P 7/62
 //(C 1 2 P 7/62
 C 1 2 R 1:645)
 (C 1 2 P 7/62
 C 1 2 R 1:785)

F I

C 1 2 P 7/62
 C 1 2 P 7/62
 C 1 2 R 1:645
 C 1 2 P 7/62
 C 1 2 R 1:785

テーマコード (参考)

4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2002-516338 (P2002-516338)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月20日 (2001.7.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年1月27日 (2003.1.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/008421
 (87) 国際公開番号 W02002/010422
 (87) 国際公開日 平成14年2月7日 (2002.2.7)
 (31) 優先権主張番号 100 36 515.9
 (32) 優先日 平成12年7月27日 (2000.7.27)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31) 優先権主張番号 100 56 025.3
 (32) 優先日 平成12年11月11日 (2000.11.11)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

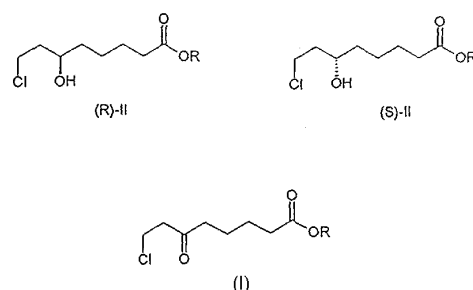
(71) 出願人 502071986
 フィアトリス ゲゼルシャフト ミット
 ベシュレンクテル ハフツング ウント
 コンパニー コマンディトゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国, 60314 フランク
 フルト アム マイン, バイスミューラー
 シュトラッセ 45
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルのエナンチオ区別還元のための方法

(57) 【要約】

本発明は一般式 (I) の8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステル (式中、RはC₁-4 アルキル) から、一般式 (R)-II (S)-II の (R) もしくは (S)-8-クロロ-6-ヒドロキソオクタン酸アルキルエステル (式中、Rは上記のとおり) の生産のための方法に関連する。所望の鏡像異性体の生産は、生物触媒によりエナンチオ区別反応により、達成されている。ここにおいて、(S)-II化合物に関してムコール・ラセモサス (*Mucor racemosus*) 及び (R)-II化合物に関してゲオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) を用いている。このようにして得たエステルは汎用の方法論により、立体特異的に (R)- α -リポ酸へと転換されて良い。

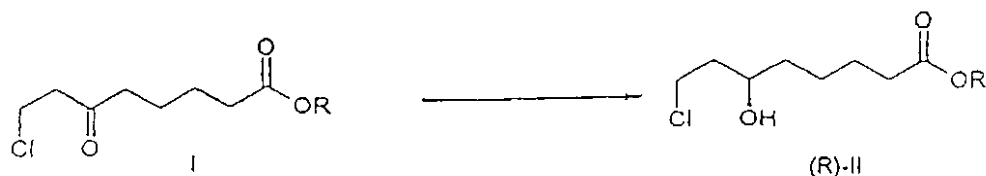


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I の 8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルからの式 (R)-II の (R)-8-クロロ-6-ヒドロキシオクタン酸アルキルエステル (式中、R はそれぞれ C₁-4 アルキルである) の生産の為の方法であって、反応が生体触媒により行われていることを特徴とする、方法。

【化 1】



10

【請求項 2】

式 I の 8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルからの式 (S)-II の (S)-8-クロロ-6-ヒドロキシオクタン酸アルキルエステル (式中、R はそれぞれ C₁-4 アルキルである) の生産の為の方法であって、反応が生体触媒により行われていることを特徴とする、方法。

【化 2】



30

【請求項 3】

8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸メチルエステルをプロキラル出発化合物として用いていることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の方法。

40

【請求項 4】

生体触媒としてゲオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) 種の株を用いていることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

所定の株 (DSM 13776) のゲオトリクム・カンジダムを用いていることを特徴とする、請求項 1 又は 4 記載の方法。

【請求項 6】

生体触媒としてムコール・ラセモサス (*Mucor racemosus*) 種の株を用いていることを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 7】

50

所定の株 (DSM 13775) のムコール・ラセモサスを用いていることを特徴とする、請求項2又は6記載の方法。

【請求項8】

完全合成培地が生物工学的生産の為に用いられており、この培地が更なる栄養塩類と一緒に炭素源、無機窒素源を含むことを特徴とする、請求項1、2、4-7のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

前記方法により生じる、任意の式 (R) - II の (R) - 8-クロロ-6-ヒドロキシオクタン酸もしくは式 (S) - II の (S) - 8-クロロ-6-ヒドロキシオクタン酸 (式中、Rはそれぞれ水素である) を、公知の方法のエステル化によって、式 (R) - II もしくは (S) - II のアルキルエステル (式中Rはそれぞれ C_{1-4} アルキルである) に転換することを特徴とする、請求項1-8のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、ムコール・ラセモサス (*Mucor racemosus*) か又はゲオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) 株の助けによって、所望したように、反応産物の対応する (S) - 又は (R) - 鏡像異性体をそれぞれ得るのに、式 I のプロキラル 8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルの新規生体触媒によるエナンチオ区別還元のための方法に関連する。公知の方法において、一度キラル中心が形成されると、R- α -リポ酸への更なる立体特異性の転換が進みうる (DE 195 33 881)。 α -リポ酸は主にラセミ化混合物として、糖尿病性の神経障害及び慢性の肝臓の疾患の治療をする為に用いられている。生物学的な活性を示すのは天然の (R) - (t) - 立体異性体のみなので、この純粋な天然物質の不斉合成は非常に重要である。

【0002】

公知の先行技術の特性

化合物 I は公知であり且つラセミチオクト酸の大規模な工業生産のための中間体として働く (M. W. Ballou ら、J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 1828)。

【0003】

刊行物には化学的な合成法のみならず、鏡像異性体として純粋な (R) - α -リポ酸の生産のための生体触媒による副次段階を含んで成る方法の記載もある (総論: J. S. Yadav ら、J. Sci. Ind. Res. 1990, 49, 400)。化学的な不斉合成の方法には一般的に高価且つ複雑な出発物質が必要である。その理由は、例えばエナンチオ区別化学触媒の利用の可能性が特殊な電子的な且つ立体的な構造の特性に関連しているからである。

【0004】

一方で、生体触媒による副次段階を伴う生産方法は、リパーゼ及びオキシドレダクターゼの酵素製剤、他方では酵母 (yeast) を用いる。

【0005】

公知のリパーゼが触媒する方法の段階 (Y. R. Santosh Laxmi 及び D. S. Iyengar, Synthesis, 1996, 594; N. W. Fadnavis 及び K. Koteswar, Tetrahedron: Asymmetry 1997, 8, 337; N. W. Fadnavis ら、Tetrahedron: Asymmetry 1998, 9, 4019; S. Lee and Y. Ahn, J. Korean Chem. Soc. 1999, 43, 128) は、純度の高い鏡像異性体を達成する為に、エナンチオ区別エステル解裂を基礎としている。これらの方法はラセミ混合物より出発する。生体触媒による反応では、鏡像異性体として純粋な化合物を獲得するのに利用できるラセミ混合物はせいぜい 50% である。残留する不要な鏡像異性体は、廃棄するか又は複雑な反応段階によりラセミ混合物へと転換し直さなければなら

10

20

30

40

50

ない。単一のオキシゲナーゼによる方法 (B. Adgenら、Bioorg, Biomed. Chem. 1997, 5, 253) は高価な補酵素、例えばNADHもしくはNADPHか又は高価な補酵素再循環系が必要になる。

【0006】

ムコール及びゲオトリクム属の酵母 (サッカロミセス・セレビジアエ) (Saccharomyces cerevisiae) 及び真菌 (fungi) を中間体の生体触媒による転換に利用できる。

【0007】

酵母は、長きに渡りβ-ケトエステルの還元反応、エステルの開裂及び他の合成において生体触媒として用いられている (総論: S. Servi, Synthesis 1990, 93, 1)。

【0008】

実際には、エナンチオ区別エステル開裂反応はムコール種 (例えばムコール・ミエヘイ (Mucor miehei) 及びムコ・ジャバニクス (Mucor javanicus)) に関して詳細に記載されている。ムコール・ラセモサスはテトラメチルシクロヘキサンジオンの還元に関連してのみ説明されている (J. d'Angeloら、J. Org. Chem. 1986, 51, 40) 一方で、β-ケトエステルの生体触媒による還元はゲオトリクム・カンジダムに関して記載されている (B. Wipfら、Helv. Chim. Acta 1983, 66, 485)。

【0009】

これ迄に、酵母 (A. S. Gopalan及びH. K. Hollie, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 5705; L. Dasaradhiら、J. Chem. Soc., 1990, 729; M. Bezbaruhaら、Synthesis, 1996, 1289; DE 40 37 440) か又はゲオトリクム・カンジダム (B. Wipfら、Helv. Chim. Acta 1983, 66, 485) により、中間体を、反応中心に対するβ位において酵素がない小さなリガンドで、対応するS-もしくはR-鏡像異性体へとエナンチオ区別転換をできる方法は知られていない。代わりに、巨大な、酸素を含有するリガンドが、複雑な中間段階によって、ケト基に対するβ位へと導入され、かくして、そのリガンドがエナンチオ区別転換を可能にするものであった。

【0010】

本明細書中に記載した解決法において、既知の合成法と比較して、用いた出発物質は、ケト基に対してα-又はβ-位においてのみとても小さなリガンドを持つが、高度なエナンチオ区別により転換されるものである。

【0011】

本明細書中で提示した解決法実際には驚くほどに公知の先行技術に関連する。その理由は、K. Nakamuraら、Tetrahedron Letters 29, 2453-4, 1988 には、デヒドロゲナーゼは、エステル官能基のみを認識し且つ反応中心に隣接する位置の塩素原子は認識せず且つエナンチオ区別転換を生じる記載があるからだ。

【0012】

本発明の詳細な説明

従って、本発明の基礎となる目的は、公知の合成の基本的な要素を利用する一方で、より簡単且つ一層経済的な、細菌を基礎とする(R)-α-リポ酸合成系内の不斉誘導の為の方法を供することだ。

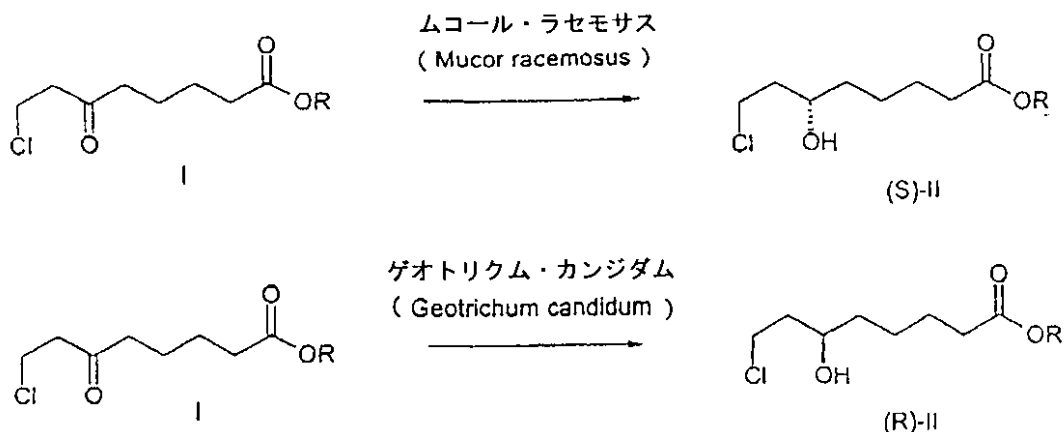
【化3】

10

20

30

40



$R = C_1-C_4\text{-アルキル}$

10

20

【0013】

本発明に従い、前記の目的は新規の方法により達成された。その方法は、所望のとおりにより、株ムコール・ラセモサスか又はゲオトリクム・カンジダムの助けによって、それぞれ対応する（S）－もしくは（R）－鏡像異性体を産出する為に、式 I のプロキラル 8－クロロ－6－オキソ－オクタン酸アルキルエステル（式中、R は $C_1 - C_4$ アルキルである）のエナンチオ区別還元を可能にする。8－クロロ－6－オキソ－オクタン酸メチルエステルが特に有効であることが証明されている。

【0014】

式（R）－II の（R）－鏡像異性体を産出するプロキラル化合物のエナンチオ区別還元は、ゲオトリクム・カンジダムの助けにより進む。プロキラル前駆体の、式（S）－II の（S）－鏡像異性体への転換は、ムコール・ラセモサスにより達成されて良い。

30

【0015】

式 I の 8－クロロ－6－オキソ－オクタン酸アルキルエステルの還元の高高度なエナンチオ区別性は予測されていなかった。何故なら、高度な不斉誘導は、立体的及び／又は電子的に非常に異なる基がケト基に対して α もしくは β 位の両側に対する選択性を促進する化合物に関する文献にのみ記載されていたからだ。更に驚くべきことには、2つの株は又高い収率及びエナンチオ区別性で、対照的な鏡像異性体への転換を触媒することができうることが分かった。

【0016】

本発明に係る方法は、式（R）－II の 8－クロロ－6－ヒドロキシオクタン酸アルキルエステルを、汎用の真菌栄養アガー、好適には Sabouraud のグルコースアガー上でゲオトリクム・カンジダム（DSM 13776）を培養することにより獲得可能であることにおいて、先行技術と異っている。この株は好適には、1%のイースト・エキストラクト、2%のペプトン及び2%のグルコースを伴う複合培地を用いることで前培養されている。バイオマスの更なる増殖は、炭素源としてグルコース、窒素源として硫酸アンモニウムを更なる栄養塩類と共に含む、好適には、20 g/l のグルコース、3 g/l の $(NH_4)_2SO_4$ 、4 g/l の KH_2PO_4 、0.5 g/l の $MgSO_4$ 、0.2 g/l の NaCl、0.2 g/l のイースト・エキストラクト、3 mg/l の $FeCl_3 \times 6H_2O$ 、3 mg/l の $CaCl_2 \times 2H_2O$ 、0.4 mg/l の $MnSO_4 \times H_2O$ 、0.

40

50

5 mg/l の $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 及び 0.05 mg の $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ の組成における完全合成培地において達成されている。前培養及び本培養のどちらも 19–28℃、好適には 24℃ で、1–5 日、好適には 3 日に渡り、オービタルシェーカー (orbital shaker) 上で 100–300 rpm、好適には 190 rpm で振とうすることにより行う。

【0017】

実際の生物触媒による転換は、エネルギー源としてグルコースの添加により緩衝化した水性溶液中で行われている。生物触媒の濃度は、バイオマス固体 0.1–100 g/l、好適にはバイオマス固体 5 g/l である。基質を 5 g/l の濃度において生体内変換バッチに添加している。生体内変換を 24℃ で 1–3 日に渡る振とうで行っている。

10

【0018】

一度生体内変換が完了すると、バイオマスを遠心しそして有機溶媒で、好適には酢酸エチルで 2 度上清を抽出する。得た抽出物を脱水し乾燥する。粗製の産物は、公知の方法において、後のエステル化により所定のアルキルエステルに変換される式 (R)–II (R=H) の (R)–8–クロロ–6–ヒドロキシオクタン酸 (DE 195 33 881) ある割合でを含む。

【0019】

ムコール・ラセモサス (DSM 13775) を、培養しそしてゲオトリクム・カンジダムに関して記載したのと同じ方法により、更に転換を行った。

【0020】

粗製の産物は、公知の方法において、後のエステル化により所定のアルキルエステルに変換される、式 (S)–II (R=H) の (S)–8–クロロ–6–ヒドロキシオクタン酸 (DE 195 33 881) のある割合でを含む。

20

【0021】

本発明に従う方法を用いて生産された化合物 (R)–II 及び (S)–II は一般的に、光学的収率 70–95% に値し、鏡像異性体の増えたこと示す。鏡像異性体の比率は光学活性カラムによるキラルガスクロマトグラフィーにより直接測定されている。

【0022】

実施例

実施例 1

ムコール・ラセモサス株 (DSM 13775) を Sabouraud のアガー上 24℃ で培養した。100 ml の YPD 栄養溶液 (1% のイースト・エキストラクト、2% ペプトン及び 2% のグルコース) を接種ループにより接種し、そしてオービタルシェーカー (190 rpm) により 24℃ で 3 日間に渡りインキュベートした。この培養物の 10% を 100 ml の SMG 培地 (20 g/l のグルコース、3 g/l の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、4 g/l の KH_2PO_4 、0.5 g/l の MgSO_4 、0.2 g/l の NaCl 、0.2 g/l のイースト・エキストラクト、3 mg/l の $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 、3 mg/l の $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.4 mg/l の $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 、0.5 mg/l の $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 及び 0.05 mg の $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) に移植し、そして 24℃ で更に 3 日に渡り培養した。

30

40

【0023】

生じたバイオマスを遠心し、そして 5 g/l のグルコースを含んで成る 100 ml の緩衝化水性溶液 (50 mmol のリン酸 Na 緩衝液、pH 6.5) 中に移植した。0.5 g の 8–クロロ–6–オキソ–オクタン酸メチルエステルを 2 ml のエタノールに溶かし、そして生体内変換バッチに添加した。24 時間後、前記バイオマスを除去し、そして培地を 50 ml ずつの酢酸エチルにより 2 度抽出した。抽出物を組み合わせ、そしてロータリー・エバポレーター中で溶媒をストリッピングした。残留物を再度 10 ml のメタノール中に溶かし、そして 0.04 ml の濃 HCl の添加後、1 時間に渡り還流した。次いで蒸留により溶媒を除去した。カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル：ヘキサン 3：1) により一度、残留物を精製し、0.33 g (66%) の (S)–8–クロロ–

50

6-ヒドロキシオクタン酸メチルエステルを、鏡像異性体を92%（キラルGC）で得ている。

【0024】

実施例2

ゲオトリカム・カンジダム株（DSM 13776）をSabouraudのアガー上24℃で培養した。100mlのYPD栄養溶液（1%のイースト・エキストラクト、2%ペプトン及び2%のグルコース）を接種ループにより接種し、そしてオービタルシェーカー（190rpm）により24℃で3日間に渡りインキュベートした。この培養物の10%を100mlのSMG培地（20g/lのグルコース、3g/lの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、4g/lの KH_2PO_4 、0.5g/lの MgSO_4 、0.2g/lの NaCl 、0.2g/lのイースト・エキストラクト、3mg/lの $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 、3mg/lの $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.4mg/lの $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 、0.5mg/lの $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 及び0.05mgの $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ）に移植し、そして24℃で更に3日に渡り培養した。

10

【0025】

生じたバイオマスを遠心し、そして5g/lのグルコースを含んで成る100mlの緩衝化水性溶液（50mmolのNaリン酸緩衝液、pH6.5）中に移植した。0.5gの8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸メチルエステルを2mlのエタノールに溶かし、そして生変換バッチに添加した。24時間後、前記バイオマスを除去し、そして培地を50mlの酢酸エチルにより2度抽出した。抽出物を組み合わせ、そしてロータリー・エバポレーター中で溶媒をストリッピングした。残留物を再度10mlのメタノール中に溶かし、そして0.04mlの濃HClの添加後、1時間に渡り還流した。次いで蒸留により溶媒を除去した。カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、酢酸エチル：ヘキサン 3：1）により一度、残留物を精製し、0.31g（62%）の（R）-8-クロロ-6-ヒドロキシオクタン酸メチルエステルを、鏡像異性体を88%（キラルGC）で得ている。

20

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/10422 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12P 7/42 //
(C12P 7/42, C12R 1:645) (C12P 7/42, C12R 1:785)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ASTA MEDICA AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; An der Pikardie 10, 01277 Dresden (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08421

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juli 2001 (20.07.2001)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLBRICH, Matthias
[DE/DE]; Käthe-Kollwitz-Strasse 29, 01468 Reichenberg
(DE). GEWALD, Rainer [DE/DE]; Martin-Ander-
sen-Nexö-Strasse 24, 01217 Dresden (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: WIBBELMANN, Jobst; Wuesthoff &
Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, 81541 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

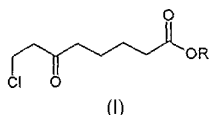
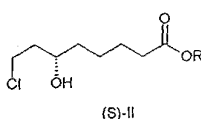
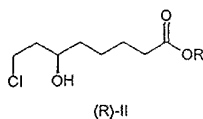
(30) Angaben zur Priorität:
100 36 515.9 27. Juli 2000 (27.07.2000) DE
100 56 025.3 11. November 2000 (11.11.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF 8-CHLORO-6-OXO-OCTANOIC ACID ALKYL ES-
TERS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENANTIOSELEKTIVEN REDUKTION VON 8-CHLOR-6-OXO-OCTANSÄUREAL-
KYLESTERN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of (R)- or (S)-8-chloro-6-hydroxyoctanoic acid alkyl esters of
general formula (R)-II or (S)-II, where R = C₁₋₄ alkyl, from 8-chloro-6-oxo-octanoic acid alkyl esters of general formula (I), where
R has the above meaning. The production of the desired enantiomers is achieved biocatalytically by means of an enantioselective
reaction, whereby the strains *Mucor racemosus* for (S)-II compounds and *Geotrichum candidum* for (R)-II compounds are used. The
esters thus obtained can be stereospecifically converted to (R)- α -lipoic acid by conventional methodology.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/10422 A1

WO 02/10422 A1



LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäß Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (R)- bzw. (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der allgemeinen Formel (R)-II oder (S)-II, worin R die Bedeutung C₁₋₇-Alkyl hat, aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der allgemeinen Formel (I), worin R die obige Bedeutung hat. Die Herstellung der gewünschten Enantiomeren erfolgt biokatalytisch in einer enantioselektiven Reduktion, wobei wahlweise die Stämme *Mucor racemosus* für (S)-II-Verbindungen und *Geotrichum candidum* für (R)-II-Verbindungen eingesetzt werden. Die erhaltenen Ester können in bekannter Weise stereospezifisch zu (R)- α -Liponsäure umgesetzt werden.

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues biokatalytisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von prochiralen 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I wahlweise mit Hilfe der Stämme *Mucor racemosus* bzw. *Geotrichum candidum* zum entsprechenden (S)- bzw. (R)-Enantiomer der Reaktionsprodukte. Nach Bildung des Chiralitätszentrums kann in bekannter Weise die weitere stereospezifische Umsetzung zu (R)- α -Liponsäure erfolgen (DE 195 33 881). Als Racemat wird α -Liponsäure vor allem zur Behandlung der diabetischen Neuropathie sowie akuter und chronischer Lebererkrankungen eingesetzt. Da ausschließlich das natürliche (R)-(+)-Enantiomer die biologische Aktivität aufweist, ist die asymmetrische Synthese dieses reinen Naturstoffes von großer Wichtigkeit.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Verbindungen I sind bekannt und dienen als Zwischenprodukte der großtechnischen Herstellung von racemischer Thioctsäure (M.W. Bullock et al., J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 1828).

Für die Herstellung der enantiomerenreinen (R)- α -Liponsäure werden sowohl chemische Syntheseverfahren, aber auch Verfahren mit biokatalytischen Teilstufen in der Literatur beschrieben (Übersichtsartikel: J.S. Yadav et al., J. Sci. Ind. Res. 1990, 49, 400). Chemische asymmetrische Syntheseverfahren benötigen in der Regel kostenintensive und komplizierte Ausgangsverbindungen, da z.B. die Möglichkeiten des Einsatzes der enantioselektiven Chemokatalyse an bestimmte elektronische und sterische Strukturmerkmale gebunden sind.

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

2

Bei den Herstellungsverfahren mit biokatalytischen Teilstufen werden zum einen Enzympräparationen von Lipasen und Oxydoreductasen und zum anderen Hefe eingesetzt.

Die bekannten lipasekatalysierten Verfahrensstufen (Y.R. Santosh Laxmi und D.S. Iyengar, *Synthesis*, 1996, 594; N.W. Fadnavis und K. Koteswar, *Tetrahedron: Asymmetry* 1997, 8, 337; N.W. Fadnavis et al., *Tetrahedron: Asymmetry* 1998, 9, 4109; S. Lee und Y. Ahn, *J. Korean Chem. Sc.* 1999, 43, 128)

beruhen auf der Enantioselektivität der Esterspaltung zur Erzielung einer hohen Enantiomerenreinheit. Dabei werden racemische Gemische vorgelegt. Die biokatalytische Reaktion kann nur max. 50 % des racemischen Gemisches zur Gewinnung der enantiomerenreinen Verbindung nutzen. Das verbleibende unerwünschte Enantiomer muß entweder verworfen werden oder über aufwendige Reaktionsstufen zu einem racemischen Gemisch zurückverwandelt werden.

Verfahren mit Monooxygenasen (B. Adger et al., *Bioorg. Biomed. Chem.* 1997, 5, 253) benötigen kostenintensive Cofaktoren, wie NADH oder NADPH oder kostenintensive Cofactorrecyclingsysteme.

Für Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie Pilze der Gattungen *Mucor* und *Geotrichum* ist bekannt, daß sie zur biokatalytischen Umsetzung von Intermediaten fähig sind.

Hefe wird bereits seit langer Zeit in Reduktionsreaktionen von β -Ketoestern, der Esterspaltung und anderen Synthesen als Biokatalysator eingesetzt (Übersichtsartikel: S. Servi, *Synthesis* 1990, 93,1).

Für *Mucor*-Arten (z. B. *Mucor miehei* und *Mucor javanicus*) sind insbesondere Reaktionen zur enantioselektiven Esterspaltung beschrieben. Während *Mucor racemosus* nur in Bezug auf die Reduktion von Tetramethylcyclohexandion (J. d'Angelo et al. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 40) erwähnt wird, ist für *Geotrichum candidum* die biokatalytische Reduktion von β -Keto-Estern beschrieben (B. Wipf et al. *Helv. Chim. Acta* 1983, 66, 485).

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

3

Alle bisher bekannten Verfahren mit Hefe (A.S. Gopalan and H.K. Hollic, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 5705; L. Dasaradhi et al., J. Chem. Soc., 1990, 729; M. Bezbarua et al., Synthesis, 1996, 1289; DE 40 37 440) bzw. *Geotrichum candidum* (B. Wipf et al. Helv. Chim. Acta 1983, 66, 485) vermögen nicht, Zwischenprodukte mit sauerstofffreien, kleinen Liganden in β -Position zum Reaktionszentrum enantioselektiv zu den entsprechenden S- bzw. R-Enantiomeren umzusetzen. Statt dessen werden über aufwendige Zwischenstufen große, sauerstoffhaltige Liganden in β -Position zur Keto-Gruppe eingeführt, die dann eine enantioselektive Umsetzung möglich machen.

In der hier beschriebenen Lösung wird gegenüber den bekannten Synthesen mit Ausgangsverbindungen gearbeitet, die nur sehr kleine Liganden in α - oder β -Stellung zur Ketogruppe tragen und trotzdem mit hoher Enantioselektivität umgesetzt werden.

Die hier dargestellte Lösung war gegenüber dem bekannten Stand der Technik besonders überraschend, da K. Nakamura et al. Tetrahedron Letters 29, 2453-4, 1988 beschreiben, dass nur Esterfunktionen und nicht Chloratome in Nachbarstellung zum Reaktionszentrum von Dehydrogenasen erkannt werden und zu enantioselektiven Umsetzungen führen.

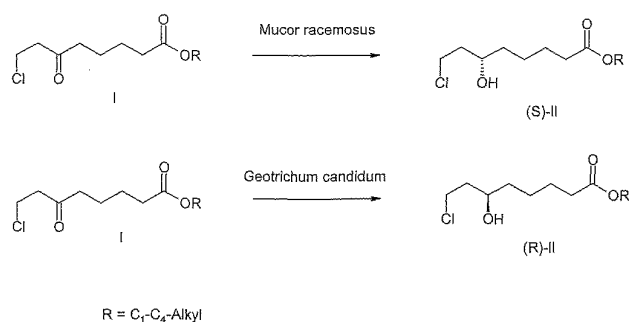
WO 02/10422

PCT/EP01/08421

4

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, unter Ausnutzung von bekannten Synthesebausteinen ein einfacheres und wirtschaftlicheres Verfahren für die asymmetrische Induktion innerhalb der (R)- α -Liponsäure-Synthesesequenz auf biokatalytischer Grundlage zu finden.



Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, dass neue Verfahren mit Mikroorganismen gefunden wurden, die eine enantioselective Reduktion der prochiralen 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylester der Formel I, worin R für C₁₋₄-Alkyl steht, wahlweise mit Hilfe der Stämme *Mucor racemosus* bzw. *Geotrichum candidum* zum entsprechenden (S)- bzw. (R)-Enantiomer erlauben.

Als besonders geeignet hat sich 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester erwiesen.

Die enantioselective Reduktion prochiraler Verbindungen zum (R)-Enantiomer der Formel (R)-II erfolgt mit Hilfe von *Geotrichum candidum*. Eine Umsetzung der prochiralen Vorstufen zum (S)-Enantiomer der Formel (S)-II kann mittels *Mucor racemosus* erreicht werden.

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

5

Die hohe Enantioselektivität der Reduktion von 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I war insofern nicht zu erwarten, da eine hohe asymmetrische Induktion in der Literatur nur für Verbindungen beschrieben wird, bei denen sterisch oder elektronisch stark unterschiedliche Gruppen auf beiden Seiten in α - oder β -Position zur Keto-Gruppe die Selektivität begünstigen. Desweiteren war überraschend, dass darüber hinaus zwei Stämme zu finden sind, die mit hoher Ausbeute und Enantioselektivität die Umsetzung zu entgegengesetzten Enantiomeren katalysieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich gegenüber dem Stand der Technik dadurch aus, daß zur Gewinnung der 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester der Formel (R)-II *Geotrichum candidum* (DSM 13776) auf einem herkömmlichen Pilznähragar, vorzugsweise Sabouraud-Glukose-Agar, angezogen wird. Für die Vorkultur des Stammes wird ein komplexes Medium, vorzugsweise mit 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton und 2 % Glukose, verwendet. Eine weitere Vermehrung der Biomasse wird in einem vollsynthetischen Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle, Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle sowie weiteren Nährsalzen erreicht, vorzugsweise in der Zusammensetzung 20 g/l Glukose, 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l MgSO_4 , 0,2 g/l NaCl, 0,2 g/l Hefeextrakt, 3 mg/l $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 3 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,4 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,05 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$. Die Kultivierung der Vorkultur als auch der Hauptkultur wird bei 19 bis 28 °C, vorzugsweise 24 °C, und über 1 bis 5 Tage, vorzugsweise 3 Tage, geschüttelt auf einem Rundschüttler bei 100 bis 300 rpm, vorzugsweise 190 rpm durchgeführt.

Die eigentliche biokatalytische Umsetzung wird in einer gepufferten wässrigen Lösung unter Zusatz von Glukose als Energiequelle durchgeführt. Die Konzentration des Biokatalysators beträgt 0,1 bis 100 g Biotrockenmasse pro Liter, vorzugsweise 5 g Biotrockenmasse pro Liter. Das Substrat wird in einer Konzentration von 5 g/l dem Biotransformationsansatz zugegeben. Die Biotransformation wird unter Schütteln bei 24 °C über 1 bis 3 Tage durchgeführt.

Nach Abschluß der Biotransformation wird die Biomasse abzentrifugiert und der Überstand mit einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Ethylacetat, zweimal extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird bis zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

6

enthält Anteile von (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (R)-II (R=H), die auf bekannte Weise durch anschließende Veresterung mit in den jeweiligen Alkylester überführt werden (DE 195 33 881).

Die Kultivierung von *Mucor racemosus* (DSM 13775) sowie die Umsetzungen damit erfolgen analog wie für *Geotrichum candidum* beschrieben.

Das Rohprodukt enthält Anteile von (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (S)-II (R=H), die auf bekannte Weise durch anschließende Veresterung in den jeweiligen Alkylester überführt werden (DE 195 33 881).

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen (R)-II und (S)-II weisen in der Regel einen hohen Enantiomerenüberschuss auf, entsprechend einer optischen Ausbeute von 70-95%. Die Enantiomerenverhältnisse werden direkt durch chirale Gaschromatographie an optisch aktiven Säulen gemessen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Der Stamm *Mucor racemosus* (DSM 13775) wird auf einem Sabouraud-Agar bei 24 °C angezogen. 100 ml YPD-Nährlösung (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton und 2 % Glukose) wird mit einer Impföse beimpft und für 3 Tage bei 24 °C auf einem Rundschüttler (190 rpm) inkubiert. 10 % dieser Vorkultur werden in 100 ml SMG-Medium (20 g/l Glukose, 3 g/l (NH₄)₂SO₄, 4 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄, 0,2 g/l NaCl, 0,2 g/l Hefeextrakt, 3 mg/l FeCl₃ x 6 H₂O, 3 mg/l CaCl₂ x 2 H₂O, 0,4 mg/l MnSO₄ x H₂O, 0,5 mg/l ZnSO₄ x 7 H₂O und 0,05 mg CuSO₄ x 5 H₂O) überführt und weitere 3 Tage bei 24 °C kultiviert.

Die erhaltene Biomasse wird abzentrifugiert und in 100 ml gepufferte wässrige Lösung (50 mmol Na-Phosphatpuffer, pH 6,5) mit 5 g/l Glukose überführt. 0,5 g 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester werden in 2 ml Ethanol gelöst und dem Biotransformationsansatz zugesetzt. Nach 24 h wird die Biomasse abgetrennt und das

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

7

Medium zweimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand

wird mit 10 ml Methanol aufgenommen und nach Zusatz von 0,04 ml konz. HCl 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Ethylacetat/Hexan=3:1) des Rückstandes erhält man 0,33 g (66%) (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäuremethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 92% (chirale GC).

Beispiel 2

Der Stamm *Geotrichum candidum* (DSM 13776) wird auf einem Sabouraud-Agar bei 24 °C angezogen. 100 ml YPD-Nährlösung (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton und 2 % Glukose) wird mit einer Impföse beimpft und für 3 Tage bei 24 °C auf einem Rundschtüttler (190 rpm) inkubiert. 10 % dieser Vorkultur werden in 100 ml SMG-Medium (20 g/l Glukose, 3 g/l (NH₄)₂SO₄, 4 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄, 0,2 g/l NaCl, 0,2 g/l Hefeextrakt, 3 mg/l FeCl₃ x 6 H₂O, 3 mg/l CaCl₂ x 2 H₂O, 0,4 mg/l MnSO₄ x H₂O, 0,5 mg/l ZnSO₄ x 7 H₂O und 0,05 mg CuSO₄ x 5 H₂O) überführt und weitere 3 Tage bei 24 °C kultiviert.

Die erhaltene Biomasse wird abzentrifugiert und in 100 ml gepufferte wässrige Lösung (50 mmol Na-Phosphatpuffer, pH 6,5) mit 5 g/l Glukose überführt. 0,5 g 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester werden in 2 ml Ethanol gelöst und dem Biotransformationsansatz zugesetzt. Nach 24 h wird die Biomasse abgetrennt und das Medium zweimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit 10 ml Methanol aufgenommen und nach Zusatz von 0,04 ml konz. HCl 1 Stunde am Rückfluss erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Ethylacetat/Hexan=3:1) des Rückstandes erhält man 0,31 g (62%) (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäuremethylester mit einem Enantiomerenüberschuss von 88% (chirale GC).

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

8

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel (R)-II aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I,



worin R jeweils die Bedeutung C₁₋₄-Alkyl hat, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mittels eines Biokatalysators durchführt.

2. Verfahren zur Herstellung von (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel (S)-II aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I,



worin R jeweils die Bedeutung C₁₋₄-Alkyl hat, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mittels eines Biokatalysators durchführt.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als prochirale Ausgangsverbindung 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester einsetzt
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Biokatalysator einen Stamm der Spezies *Geotrichum candidum* einsetzt.

WO 02/10422

PCT/EP01/08421

9

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass man *Geotrichum candidum* mit dem speziellen Stamm (DSM 13776) einsetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Biokatalysator einen Stamm der Spezies *Mucor racemosus* einsetzt.
7. Verfahren nach Ansprüchen 2 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass man *Mucor racemosus* mit dem speziellen Stamm (DSM 13775) einsetzt.
8. Verfahren nach Ansprüchen 1, 2, 4 – 7, dadurch gekennzeichnet, dass man für die biotechnologische Produktion ein vollsynthetisches Medium benutzt, das eine Kohlenstoffquelle, eine anorganische Stickstoffquelle sowie weitere Nährsalze enthält.
9. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 8, dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahren anfallende (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (R)-II oder (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (S)-II, worin R jeweils die Bedeutung Wasserstoff hat, durch Veresterung in bekannter Weise zu dem Alkylester der Formel (R)-II oder (S)-II, worin R jeweils C₁₋₄-Alkyl bedeutet, umgesetzt wird.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Arzneimittelwerk Dresden GmbH
Meißner Str. 35

01145 Radebeul

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: DSM 62760	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 13775
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde () eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zustreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2000-10-13 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest-Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. W. 16</i> Datum: 2000-10-17

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

· BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Arzneimittelwerk Dresden GmbH
Meißner Str. 35

01145 Radebeul

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Arzneimittelwerk Dresden GmbH Meißner Str. 35 Anschrift: 01145 Radebeul	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 13775 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2000-10-13
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2000-10-13 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus ☒ lebensfähig ☐ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTISCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ernannten Bediensteten:  Datum: 2000-10-17

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

" BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE "
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Arzneimittelwerk Dresden GmbH
Meißner Str. 35

01145 Radebeul

EMFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: DSM 6593	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 13776
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde () eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2000-10-13 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle beteiligten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2000-10-17

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

" BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE "
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Arzneimittelwerk Dresden GmbH
Meißner Str. 35

01145 Radebeul

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Arzneimittelwerk Dresden GmbH Meißner Str. 35 Anschrift: 01145 Radebeul	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeordnete EINGANGSNUMMER: DSM 13776 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2000-10-13
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2000-10-13 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Weh</i> Datum: 2000-10-17

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/08421
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P7/42 // (C12P7/42, C12R1:645), (C12P7/42, C12R1:785)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAMURA K ET AL: "ASYMMETRIC REDUCTION OF KETONES BY GLYCEROL DEHYDROGENASE FROM GEOTRICUM" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 29, no. 20, 1988, pages 2453-2454, XP001021318 ISSN: 0040-4039 cited in the application the whole document	1-9
X	EP 0 939 132 A (DAICEL CHEMICAL IND., LTD.) 1 September 1999 (1999-09-01) siehe insbesondere Seite 3 und Anspruch 16 claims 1-20	1,3-5,8,9
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 October 2001		Date of mailing of the international search report 05/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5015 Patentisten 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Douschan, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/08421
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PATEL, RAMESH N. ET AL: "Stereoselective reduction of beta.-keto esters by <i>Geotrichum candidum</i> " retrieved from STN Database accession no. 117:190226 XP002180887 abstract & ENZYME MICROB. TECHNOL. (1992), 14(9), 731-8 ,	1,3-5,8, 9
X	SERVIS: "BAKER'S YEAST AS A REAGENT IN ORGANIC SYNTHESIS" SYNTHESIS, GEORG THIEME VERLAG. STUTTGART, DE, vol. 93, 1990, pages 1-25, XP001018969 ISSN: 0039-7881 cited in the application page 3	1-3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/EP 01/08421	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0939132	A	01-09-1999	JP 11239478 A		07-09-1999
			EP 0939132 A1		01-09-1999
			US 6168935 B1		02-01-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Intel males Aktenzeichen PCT/EP 01/08421
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12P7/42 //((C12P7/42,C12R1:645),(C12P7/42,C12R1:785)		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKAMURA K ET AL: "ASYMMETRIC REDUCTION OF KETONES BY GLYCEROL DEHYDROGENASE FROM GEOTRICUM" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 29, Nr. 20, 1988, Seiten 2453-2454, XP001021318 ISSN: 0040-4039 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-9
X	EP 0 939 132 A (DAICEL CHEMICAL IND., LTD.) 1. September 1999 (1999-09-01) siehe insbesondere Seite 3 und Anspruch 16 Ansprüche 1-20 --- -/-	1,3-5,8, 9
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderes Dokument anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die gegenseitig einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Fachstellenbericht genannten Veröffentlichung bezeugt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie beigetragen ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsartiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsartiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 23. Oktober 2001		Abenddatum des internationalen Recherchenberichts 05/11/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Palatinen 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2540, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Berechtigter Unterschrift Douschan, K

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1999)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/08421

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PAJEL, RAMESH N. ET AL: "Stereoselective reduction of beta.-keto esters by Geotrichum candidum" retrieved from STN Database accession no. 117:190226 XP002180887 Zusammenfassung & ENZYME MICROB. TECHNOL. (1992), 14(9), 731-8 ,	1, 3-5, 8, 9
X	SERVI S: "BAKER'S YEAST AS A REAGENT IN ORGANIC SYNTHESIS" SYNTHESIS, GEORGE THIEME VERLAG. STUTTGART, DE, Bd. 93, 1990, Seiten 1-25, XP001018969 ISSN: 0039-7881 in der Anmeldung erwähnt Seite 3	1-3

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internationales Abkürzungszeichen	
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören				PCT/EP 01/08421	
Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung		
EP 0939132 A	01-09-1999	JP 11239478 A	07-09-1999		
		EP 0939132 A1	01-09-1999		
		US 6168935 B1	02-01-2001		

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 オルブリヒ, マッティアス

ドイツ連邦共和国, 01468 ライヒェンベルク, ケーテコルビッツ-シュトラッセ 29

(72)発明者 ゲバルト, ライナー

ドイツ連邦共和国, 01217 ドレスデン, マルティン-アンデルセン-ネクソー-シュトラッセ 24

Fターム(参考) 4B064 AD75 CA05 CA06 CB18 DA01