

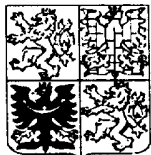
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 141

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **364-94**

(22) Přihlášeno: **19. 08. 92**

(30) Právo přednosti:
22. 08. 91 GB 91/9118149

(40) Zveřejněno: **17. 08. 94**
(Věstník č. 8/94)

(47) Uděleno: **14. 11. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **14. 01. 98,**
(Věstník č. 1/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP92/01892**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/04189**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 41/00

C 12 P 7/40

// (C 12 P 7/40, C 12 R 1:645)

(73) Majitel patentu:

LABORATORIOS MENARINI S.A., Badalona,
ES;

(72) Původce vynálezu:

Evans Christopher Thomas, Heydon, GB;
Wisdom Richard Anthony, Holbrook Road,
GB;
Stabler Peter Joseph, St. Neots, GB;
Carganico Germano, Badalona, ES;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Způsob výroby převážně jednoho
z enantiomerů chirální kyseliny
2-(benzoylfenyl)propionové**

(57) Anotace:

Podstatu řešení tvoří způsob výroby převážně jednoho z enantiomerů kyseliny 2-(benzoylfenyl)propionové ze směsi enantiomerů této kyseliny, v průběhu postupu se jako biokatalyzátor používá mikroorganismus Trichosporon ENZA I-3, IMI 348917.

CZ 283 141 B6

Způsob výroby převážně jednoho z enantiomerů chirální kyseliny 2-(benzoylfenyl)-propionové

5 Oblast techniky

Vynález se týká možnosti rozdělení enantiomerů chirální kyseliny 2-(benzoylfenyl)propionové, běžným názvem ketoprofenu, zejména získání čistého (S)-ketoprofenu.

10

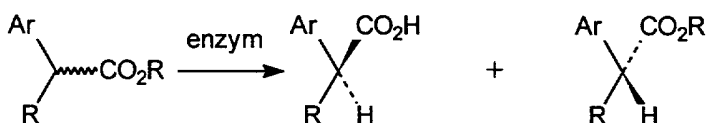
Dosavadní stav techniky

Mnoho farmaceuticky aktivních látek, připravovaných metodami chemické syntesy, je získáváno a prodáváno jako směs stereoisomerů. Často se však stává, že biologicky aktivní je pouze jeden z těchto stereoisomerů. Doprovázející enantiomer pak vykazuje jen velmi slabou či nulovou aktivitu a v některých případech může působit toxicky nebo vyvolávat nežádoucí vedlejší účinky.

Vědecké výzkumy prokázaly, že protizánětlivá aktivita 2-arylpropionových kyselin naproxenu a ibuprofenu je spojena s (S) enantiomerem. Totéž platí pro ketoprofen, běžně vyráběný a prodáváný jako racemát.

Arylalkanové kyseliny se mohou štěpit pomocí biotransformace, kterou znázorňuje následující schéma:

25



kde R je alkylová skupina, Ar je aromatický zbytek a R je například alifatický zbytek s 1 až 4 uhlíkovými atomy.

Zvláštním úkolem tohoto vynálezu je navrhnout ekonomický způsob výroby opticky čistého (S)-ketoprofenu.

35

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob výroby převážně jednoho z enantiomerů kyseliny 2-(benzoylfenyl)propionové ze směsi enantiomerů této kyseliny, v průběhu postupu se jako biokatalyzátor používá mikroorganismus *Trichosporon ENZA I-3*, IMI 348917.

Postup zahrnuje biokatalytickou hydrolýsu esteru racemického ketoprofenu, kterou vzniká biotransformační bujón, poskytující ketoprofenovou kyselinu, podstatně obohacenou jedním enantiomerem, a ester ketoprofenu, značně obohacený druhým enantiomerem. Pokud je kyselý produkt biotransformace požadovaným enantiomerem obohacen dostatečně, může být dalšího zlepšení optické čistoty dosaženo snadno a hospodárně použitím standardních chemických postupů za vzniku sole s opticky vysoce čistým chirálním aminem a následnou krystalizací z roztoku. Ester ketoprofenu zbylý po biotransformaci lze snadno vyčistit, chemicky racemizovat a recyklovat pro další biotransformaci, čímž se zmenší náklady na výchozí materiál.

50

Přednost uváděného vynálezu spočívá v objevu biokatalyzátoru, který je vhodný pro výše popsanou biotransformaci: mikrob (ENZA-I3) se výjimečně hodí k dosažení žádaného rozlišení. Tento mikroorganismus byl původně izolován při testování vzorků z čistíren odpadních vod, které sledovalo možnost růstu v ethanolu jako jediném zdroji uhlíku. Následující testování mikroorganismu na plotnách, které obsahovaly ethylketoprofen, prokázalo, že kolem kolonií ENZA-I3 dochází po jejich nárůstu k extensivnímu uvolňování ve vodě nerozpustného ethylketoprofenu (což nasvědčuje možné hydrolyse esteru). Prověření kapalného média potvrdilo, že ENZA-I3 hydrolysuje ethylketoprofen v kapalně fázi značně aktivněji než jiné organismy.

Bylo prokázáno, že tento kmen vykazuje množství dále uvedených vlastností, výhodných pro rozlišení (S)-ketoprofenu a racemického esteru ketoprofenu:

(a) Hydrolysuje velmi rychle estery ketoprofenu s krátkým řetězcem.

(b) Produkuje z racemického ethylketoprofenu (S)-ketoprofenovou kyselinu s tak vysokou selektivitou, pokud se týká enantiomeru, že při nízkých konverších může být získán (S)-ketoprofen o čistotě vyšší než 95 %. Při konversi blížící se 50 (40-50 %) klesá čistota na 90 %. Tato selektivita se projevuje aniž by bylo nutné odstraňovat vedlejší aktivity (což může být nákladné) anebo zvyšovat žádanou aktivitu klonováním.

(c) Záměnou substrátu z ethylketoprofenu na methylketoprofen lze změnit selektivnost biokatalyzátoru tak, že místo enantiomeru (S) je přednostně akumulována (R)-ketoprofenová kyselina. Po zvýšení biotransformace na více než 50 % může být tímto způsobem (S)-ketoprofen produkován jako methylester.

(d) Mikroorganismus rychle roste při laboratorní teplotě - dvojnásobku dosahuje za 1,5 až 2 hodiny, což umožňuje snadnou a hospodárnou přípravu biokatalyzátoru.

Izolovaný kmen byl identifikován v holandském Centrálním úřadu pro plísňové kultury (Centralbureau Voor Schimmelcultures, CBS), jako *Trichosporon laibacchii* (Windisch), který je rovněž klasifikován jako *Endomyces laibacchii*. Různé alternativní kmeny tohoto druhu jsou v CBS veřejně dostupné. Tyto kmeny, např. CBS 5791, 5790, 5381 a 2495 byly získány a testovány souběžně s organismem ENZA-I3. Testy prokázaly, že některé z těchto kmenů jsou pro biotransformaci téměř tak vhodné jako ENZA-I3. V katalogu CBS z roku 1990 (32. vydání) jsou tyto kmeny klasifikovány jako *Trichosporon beigeli*, ačkoli byly v CBS následně přejmenovány na *Endomyces laibacchii*. Testované kmeny *T. beigeli* vykazovaly podobnou selektivitu jako ENZA-I3, i když byly méně aktivní.

Mikrob ENZA-I3 byl 20. srpna 1991 uložen v Mezinárodním mykologickém institutu v anglickém Kew (International Mycological Institute, Kew, UK) za podmínek stanovených Budapešťskou dohodou a bylo mu uděleno přírůstkové číslo 348917.

Další charakteristiky mikroba ENZA-I3 jsou uvedeny následovně:

kvasný růst:	glukosa	-
aerobní růst:	D-glukosa	+
	D-galaktosa	+
	L-sorbosa	+
	D-glukosamin	+
	D-ribosa	+
	D-xylosa	+

	D-arabinsa	+	
	D-arabinsa	-	
	L-rhamnosa	+	
	sacharosa	+	
5	maltosa	+	
	$\alpha\alpha$ -trehalosa	+	
	methyl- α -glukosid	+	
	celobiosa	+	
	salicin	+	
10	arbutin	+	
	melibiosa	+	
	laktosa	+	
	rafinosa	+	
	melezitosa	+	
15	inulin	-	
	rozpustný škrob	+	
	glycerol	+	
	meso-erithritol	-	
	ribitol	-	
20	xylitol	-	
	L-arabinitol	+	
	D-glucitol	+	
	D-mannitol	-	
	galaktitol	+	
25	myoinositol	+	
	glukonolakton	-	
	D-glukonan	+	
	D-glukuronan	+	
	D-galakturonan	-	
30	di-laktát	+	
	sukcinát	+	
	citrát	+	
	methanol	-	
	ethanol	+	
35	zdroj dusíku:		
	dusičnany	-	vůči dusičnanu
	dusitany	-	
	ethylamin	+	
	L-lysin	+	
40	kadaverin	+	
	kreatin	-	
	kreatinin	+	
	růst:		
		+	při 25 °C, 30 °C
45		-	při 35 °C, 37 °C
	vzhled:		
	kolonie	-	smetanové, membranosní
	vlákna	-	dobře vyvinuté pseudohyphae/septae hyphae arthroscandida
	asci (vřetka)	-	žádné
50	teliospory/basidia	-	žádné.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ozřejmují vynález. Dále uvedená média byla použita v příkladech 1 až 5 (v nichž byl produkován (S)-ketoprofen):

5

složka	inokulační médium (g/l)	růstové médium (g/l)
síran amonný	2	2
dihydrofosforečnan draselný	10	10
síran hořečnatý (.7 H ₂ O)	0,5	0,5
kvasničný extrakt (Fould Springer)	30	50
stopové prvky	1 ml/l	1 ml/l
odpěňovací činidlo (FXO 371)*	1 ml/l	1 ml/l
glukosa	-	50

* výrobek chemické společnosti Ivanhoe, IL, USA

10

Před sterilací médií v autoklávu bylo jejich pH upraveno na hodnotu 6,5 pomocí hydroxidu sodného. Média byla před inokulací tepelně sterilována při teplotě 121 °C po dobu 20 až 40 minut. Glukosa byla sterilována ve formě 50 % roztoku odděleně od zbytku média.

15 Biotransformační směs:

fosfát sodný 100 mM, pH 6,5
 kvasničný extrakt 10 g/l
 Tween 80 5 g/l
 20 odpěňovací činidlo (FXO 371) 1 ml/l.

25

Ethylester ketoprofenu byl do biotransformační směsi přidán v takovém množství, aby jeho finální koncentrace po přidání inokula dosáhla 50 g/l. Biotransformační médium bylo tepelně sterilováno po dobu 20 až 40 minut při teplotě 121 °C; ethylester ketoprofenu byl tepelně sterilován odděleně.

Použitý roztok stopových prvků měl následující složení:

30 CaCl₂. 2 H₂O 3,57 g/l
 ZnO 2,0 g/l
 CuCl₂. 2 H₂O 0,85 g/l
 Na₂MoO₄. 2 H₂O 4,8 g/l
 MnCl₂. 4 H₂O 2,0 g/l
 FeCl₂. 6 H₂O 5,4 g/l
 35 H₃BO₃ 0,3 g/l
 CoCl₂. 6 H₂O 2,4 g/l
 HCl 250 ml/l.

40 Příklad 1

Buňky (ENZA-I3) byly naočkovány na agarové plotny YM (výrobek firmy Difco) a inkubovány 2 dny při 23 °C. Jednoduchá kolonie pak byla přenesena do 75 ml inokulačního média v 500 ml třepačkové baňce a celý obsah byl ponechán 24 hodin aerobnímu růstu při 2 °C. Pak byla kultura

přenesena do kvasného tanku o obsahu 2,8 l, který obsahoval 1,5 l růstového média, zahřátého na teplotu 23 °C. Růst probíhal po 10 hodin za dostatečného provzdušňování a míchání k udržení aerobních podmínek. Nakonec bylo 150 ml výsledné kultury převedeno v 1,35 l biotransformačního média do nádoby o obsahu 2,8 l. Po dobu následné biotransformace byla kultura míchána (1200 rpm), provzdušňována (0,5 vvm) a teplota byla udržována na 23 °C. Vzorek odebraný po 20 hodinách od začátku biotransformace obsahoval ketoprofen v koncentraci 7 g/l a o čistotě 98 % enantiomeru (S). Ve vzorku, odebraném 73 hodin od začátku inkubace, byla koncentrace ketoprofenu 23,3 g/l o čistotě 94 % (S)-ketoprofenu.

10

Příklad 2

Podobná metoda jako v příkladu 1 byla použita ve větším měřítku. Po naočkování buněk na agarové plotny (firmy Difco) a dvoudenní inkubaci byly jednotlivé kolonie přeneseny do čtyř jednodenní kultivací byl obsah všech lahví převeden do 15 l kvasného tanku, obsahujícího 9 l růstového média. Po 10 hodinách aerobního růstu byla zahájena biotransformace přenesením 5 l buněčného bujónu do 75 litrové nádoby, která obsahovala 45 l biotransformačního média. Udržení aerobních podmínek zajišťoval přívod vzduchu o rychlosti 0,2 vvm a směs byla promíchávána rychlostí 500 ot/min. Analýza vzorku, odebraného 71 hodin po začátku biotransformace, prokázala vznik ketoprofenu o koncentraci 17 g/l a čistotě 93 % ve prospěch (S) enantiomeru.

25 Příklad 3

Kultury různých kmenů, které jsou dostupné v CBS a jsou uvedeny v následující tabulce, byly z čerstvých agarových ploten YM přeneseny do 250 ml lahví, obsahujících 25 ml růstového média bez glukosy. Po 24 hodinách růstu bylo 5 ml z každé kultury přeneseno do 250 ml kultivačních lahví, obsahujících po 20 ml biotransformačního média. Vzorky byly odebírány po 72 hodinách protřepávání při 23 °C a jejich výsledky uvádí následující tabulka:

Kmen	vzniklý ketoprofen (g/l)	% (<u>S</u>) ketoprofenu
ENZA-I3 T. <u>laibacchii</u>	20	94
CBS 5791 T. <u>laibacchii</u>	17	93
CBS 5790 T. <u>laibacchii</u>	15	61
CBS 5381 T. <u>laibacchii</u>	13	93
CBS 2495 T. <u>laibacchii</u>	5	.*
CBS 6858 <u>Trichosporon</u> Sp	<1	.*
CBS 5959 T. <u>beigelii</u>	1	.*
CBS 2466 T. <u>beigelii</u>	<1	.*

* Obtížné přesně stanovit vzhledem k nízké koncentraci; selektivita vůči (S) enantiomeru (menší či větší) však byla u těchto kmenů pozorována

40 Příklad 4

Bylo experimentálně prokázáno, že účinnost biokatalyzátoru při biotransformaci je obdobná při 23 °C i při 26 °C. Rychlost biotransformace, probíhající při 20 °C se podobá rychlosti transformace při 23 °C, ale selektivita biokatalyzátoru vzhledem k enantiomeru klesá natolik, že při standardní biotransformaci (příklad 1) vzniká po 72 hodinách kyselý produkt o obsahu pouze

88 % (S)-ketoprofenu (namísto 93 - 94 %). Při 30 °C klesá rychlost katalýzy o 40 - 50 % a zhoršuje se i selektivita vzhledem k enantiomeru.

5 Příklad 5

Vliv pH

Aktivita mikroorganismu byla zaznamenána mezi pH 4,5 a 7,5 (a téměř určité přetrvává i výše, což však nebylo testováno). Selektivita biokatalyzátoru signifikantně klesá při pH nižším než 4,5. Optimální pH je uvažováno v rozmezí hodnot od 6,5 do 7,5.

Za použití standardní metody (příklad 1) bylo při pH 4,5 nalezeno ve vzorku odebraném v 66 hodině 8 g/l ketoprofenu (o čistotě 91 % (S) enantiomeru); při pH 6,5 obsahoval vzorek, odebraný ve stejném čase, 24 g/l ketoprofenu, tvořeného z 94 % (S) enantiomerem a při pH 7,5 obsahoval vzorek, odebraný po 66 hodinách transformace, 23 g/l ketoprofenu (o čistotě 80 % (S) enantiomeru).

20 Příklad 6

Vliv délky řetězce

Buňky byly pěstovány v médiu o pH 6,5 (upraveném hydroxydem sodným), obsahujícím 25 g/l kvasničného extraktu, 10 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l heptyhydrátu síranu hořečnatého, 2 g síranu amonného a 1 ml/l roztoku stopových prvků (CaCl₂·2H₂O - 53 g/l, FeSO₄·7H₂O - 2 g/l, MnSO₄·H₂O - 100 mg/l, ZnSO₄·7H₂O - 200 mg/l, CuSO₄ - 40 mg/l, CoCl₂·6H₂O - 60 mg/l, NaMoO₄ - 40 mg/l a H₃BO₃ - 30 mg/l). Po celonoční kultivaci byly kultury z 20 % přeneseny do 250 ml kultivačních lahví, které shodně obsahovaly 25 ml uvedeného média, ale lišily se přidavkem odlišných ketoprofenových esterů o konečné koncentraci 10 g/l. Byla sledována rychlost biotransformace a čistota ketoprofenového enantiomeru; výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

ester ketoprofenu	relativní rychlost hydrolysy	čistota
methyl	70	86 % (<u>R</u>)-ketoprofen
ethyl	100	93 % (<u>S</u>)-ketoprofen
butyl	65	78 % (<u>S</u>)-ketoprofen
oktyl	38	54 % (<u>S</u>)-ketoprofen

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Způsob výroby převážně jednoho z enantiomerů chirální kyseliny 2-(benzoylphenyl)-propionové ze směsi enantiomerů této kyseliny, **vyznačující se tím**, že se v průběhu postupu jako biokatalyzátor používá mikroorganismus Trichosporon ENZA I-3, IMI 348917.

10

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se provádí při hodnotě pH 4,5 až 7,5.

15

3. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se provádí při teplotě v rozmezí 20 až 30 °C.

20

Konec dokumentu
