

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 875251 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 875251

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 7/40
C12P 41/00

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 27.11.1987

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 27.11.1987

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 02.06.1988

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

01.12.1986 GB 8628693

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Gist-Brocades N.V., 1, Wateringseweg 2611 XT Delft, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Shell Internationale Research, 30, Carel van Bylandtlaan 2501 AN den Haag, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Bertola, Mauro Attilio, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Marx, Arthur Friedrich, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Koger, Hein Simon, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

4 •Phillips, Gareth Thomas, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä 2-aryylipropionihappojen valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av 2-arylpropionsyror.

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

101.67 CBS

257.86 CBS

520.82 CBS

207.35 CBS

258.86 CBS

537.76 CBS

232.33 CBS

259.86 CBS

256.86 CBS

269.28 CBS

Menetelmä 2-aryylipropionihappojen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av 2-arylpropionsyror

Tämä keksintö koskee stereospesifistä menetelmää 2-aryyli-propionihappojen, edullisesti farmaseuttisesti aktiivisen yhdisteen, josta ainakin 70 paino-% on S-konfiguraatiossa, valmistamiseksi.

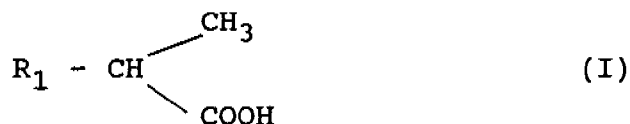
Monia biologisesti aktiivisia yhdisteitä syntetisoidaan stereoisomeerien seoksena. Näitä seoksia käytetään yleensä sellaisinaan maanviljelyksen ja farmasian sovellutuksissa. Tavallisesti toivottu biologinen aktiivisuus on pääasiassa vain yhdellä stereoisomeerilla niin, että kahden tai useamman stereoisomeerin seoksen ollessa kyseessä seosten teho on alentunut. Suurin syy, miksi stereoisomeerien seoksia käytetään, on se, että stereoisomeerien erotuskustannukset ylittävät sen potentiaalisen edun, joka mahdollisesti saavutetaan aktiivisuuden lisäyksenä. Kuitenkin on ilmeistä, että nykyiset farmakologit tulevat lisääntyvässä määrin tietoisiksi muista haittavaikutuksista annostettaessa seoksia, joissa on ainoastaan epäpuhtautena pidettävä yksi tai useampi stereoisomeeri, joilla ei ehkä ole toivottua terapeuttista vaikutusta mutta joilla voi olla muita, ei-toivottuja fysiologisia vaikutuksia, mm. myrkyllisyys.

Erityisesti on tunnettua, että naprokseenin ja ibuprofeenin in vitro anti-inflammatorinen aktiivisuus on S-enantiomeerilla (optisesti aktiivinen stereoisomeeri), joka on jopa 150 kertaa niin aktiivinen kuin sen antipodi [S. Adams et al., J. Pharm. Pharmac., 28 (1976) 256 ja A. J. Hutt ja J. Caldwell, Clinical Pharmacokinetics 9 (1984) 371].

Ibuprofeenin inaktiivisen R-enantiomeerin selektiivinen valmistus käyttämällä 1-isobutyryyli-4-(1'-metyylioktyyli)-bentseenin mikrobista hapetusta, joka yhdiste on aromaattinen hiilivety, jolla on sopiva ei-funktionaalinen alifaattinen sivuketju, tunnetaan julkaisusta T. Sugai ja K. Mori (Agric. Biol. Chem., 48 (1984) 2501).

Sen tähden yhä tarvitaan suuresti menetelmää, jolla teollisessa mittakaavassa voidaan saada taloudellisesti huomattavia saantoja valmistettaessa näitä S-enantiomeereja. Tämän keksinnön kohteena on tällainen menetelmä.

Tuloksena laajasta tutkimuksesta ja kokeilusta on nyt yllättäen löydetty stereoselektiivinen menetelmä 2-aryylipropionihappojen valmistamiseksi, erityisesti farmaseuttisesti aktiivisen yhdisteen valmistamiseksi, josta ainakin 70 paino-% on S-konfiguraatiossa, ja jonka kaava I on



tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin valmistamiseksi, jossa kaavassa R_1 tarkoittaa mahdollisesti substituoitua aryyli-ryhmää, kuten fenyyli- tai naftyyli-ryhmää, jossa menetelmässä kaavan (II) mukainen yhdiste



jossa R_1 tarkoittaa samaa kuin edellä ja R_2 on 3-11 hiiliatomia sisältävä lineaarinen alkyyli-ryhmä, saatetaan mikro-organismin, joka on hiiva tai sieni, tai siitä peräisin olevien uutteen vaikutuksen alaiseksi, joilla on kyky stereoselektiivisesti hapettaa kaavan (II) mukainen yhdiste kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, joka on pääasiassa S-konfiguraatiossa, ja kaavan (I) mukainen yhdiste muutetaan haluttaessa sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi.

Ilmauksella "pääasiassa S-konfiguraatiossa" tarkoitetaan, että enemmän kuin 50 % saatavan yhdisteen (I) painosta on S-konfiguraatiossa ja käytännössä keksintömme mukaisesti käytetään mikro-organismeja tai siitä peräisin olevia uuttei-

ta, jotka kykenevät stereoselektiivisesti hapettamaan yhdisteen (II) yhdisteeksi (I), josta on ainakin 70 paino-%, edullisesti ainakin 80 paino-% ja erityisesti ainakin 90 paino-% S-konfiguraatiossa.

Kaavan (I) mukaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola tai esterä on edullisesti alkalimetallisuola tai maaalkalimetallisuola. R_2 on alkyyliryhmä, joka sisältää ainakin 3 hiiliatomia, ja se on mahdollisesti substituoitu esimerkiksi pentaanilla, heptaanilla tai nonaanilla. Mieluimmin kaavan (I) mukainen yhdiste on naprokseeni, ibuprofeeni, suprofeeni, fenoprofeeni, ketoprofeeni, benoksaprofeeni, karprofeeni, sikloprofeeni, pirprofeeni, lisiprofeeni, flurbiprofeeni, fluprofeeni, klidanaakki, tetriprofeeni, heksaprofeeni, indoprofeeni, meksoprofeeni, pranoprofeeni, R 803, protitsiinihappo, tiaprofeenihappo tai brofetsiili.

Tämän keksinnön edullisen suoritusmuodon mukaisesti valmistetaan naprokseenia tai ibuprofeenia pääasiallisesti S-konfiguraatiossa ja R_2 on 3-11 hiiliatomia sisältävä lineaarinen alkyyli.

Kaavan (II) mukainen yhdiste voidaan saada käyttäen tunnettuja menetelmiä tai menetelmää, jonka alan ammattimies voi helposti kehittää. Esimerkiksi 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-alkaanit syntetisoidaan lähtemällä 2-bromi-6-metoksi-naftaleenista. Viimeksi mainittu yhdiste saatetaan reagoimaan 2-alkanonin kanssa, jolloin saadaan 2-hydroksi-(6-metoksi-2-naftyyli)alkaani. Sen jälkeen tuote muutetaan 2-(6-metoksi-2-naftyyli)alkeeni-2:ksi ja hydrataan, jolloin saadaan 2-(6-metoksi-2-naftyyli)alkaani.

Sen lisäksi, että tämän keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan kaavan (I) mukaisia yhdisteitä, jotka ovat rikastuneet S-isomeerin suhteen, tämän menetelmän tuotteena on myös kaavan (II) mukainen yhdiste, joka on rikastunut R-isomeerin

suhteen. Jälkimmäinen jää jäljelle, kun S-isomeeri muunnetaan mikro-organismin tai siitä peräisin olevien uutteen avulla.

Toisin kuin 2-aryylipropaanin hapettuaessa, jolloin on mahdollista, että stereoselektiivinen hapettuminen tapahtuu 100%:isesti S-2-aryylipropionihapoksi, kaavan (II) mukaisen yhdisteen konversio tapahtuu korkeintaan 50%:isesti, kun lähdetään kaavan (II) mukaisen yhdisteen raseemisesta seoksesta.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetyt mikro-organismit pystyvät, sen lisäksi, että ne hapettavat kaavan (II) mukaisen yhdisteen stereoselektiivisesti, myös hapettamaan ainoastaan yhden hiiliatoman ryhmässä R_2 .

Termillä "mikro-organismit, jotka kykenevät stereoselektiiviseen hapetukseen" tarkoitetaan esimerkiksi sieniä, hiivan kaltaisia sieniä, hiivoja ja bakteereita ja niitä ovat mm. mikro-organismit, jotka kuuluvat sukuihin Exophiala, Rhinocladiella ja Graphium.

Suvun Exophiala sienet on kuvattu kirjassa The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture (J. A. von Arx, 1981, J. Cramer), suvun Rhinocladiella hiivasienet on kuvattu julkaisussa The Black Yeasts and Allied Hyphomycetes, 1977 (G. S. de Hoog ja E. J. Hermanides-Nijhof, CBS, Baarn, Hollanti), ja suvun Graphium sienet on kuvattu CBS:n (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baar, Hollanti) julkaisussa List of Cultures, Fungi and Yeasts, 2. painos, 1990.

Mikro-organismeja, jotka kykenevät hapettamaan kaavan (II) mukaiset yhdisteet kaavan (I) mukaisiksi yhdisteiksi, ovat Exophiala jeanselmei (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 537.76), Exophiala

mansonii (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 101.67), Exophiala jeanselmei var. heteromorpha (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 232.33), Rhinocycladiella spinifera (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 269.28), Exophiala dermatitis (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 207.35) ja Exophiala alcalophila (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 520.82).

Keksinnön mukaisessa suoritussuodossa mikro-organismit, joilla on kyky stereoselektiivisesti hapettaa kaavan (II) mukainen yhdiste kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, voidaan valita luonnollisesta lähteestä saattamalla luonnollinen lähde kosketukseen 2-(R₁)alkaanin kanssa (R₁ tarkoittaa samaa kuin edellä) hiililähteenä sopivassa kasvualustassa. Sopivasti käytetään 2-(6-metoksi-2-naftyyli)alkaania valittaessa mikro-organismeja, joilla on kyky valmistaa naprokseenia, alkaanin ollessa mieluummin pentaani, heptaani tai nonaani. Sopiva kasvualusta on esimerkiksi PS III-suolakasvualusta, joka on rikastettu vitamiiniliuoksella ja/tai 0,01%:isella hiivauutteella.

Lukuisia luonnollisista lähteistä, erityisesti maanäytteistä eristettyjä mikro-organismeja valittiin edellä esitetyn seulontamenetelmän mukaisesti, ja kun niille suoritettiin jatkokotestit, jotka esitetään jäljempänä, saatiin selville niiden kyky hapettaa stereoselektiivisesti kaavan (II) mukainen yhdiste kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi.

Eräät keksinnössä käytettävät mikro-organismit voidaan eristää maanäytteistä, käyttäen 2,5 g/l 2-(6-metoksi-2-naftyyli)heptaania hiililähteenä PS III-suolakasvualustassa, joka oli rikastettu vitamiiniliuoksella ja/tai 0,01%:isella hiivauutteella.

PS III-suolakasvualusta sisältää:

KH_2PO_4 (2,1 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1,0 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,9 g/l),
 KCl (0,2 g/l), $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 (0,2 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (2,5 mg/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 (0,5 mg/l), $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (0,3 mg/l), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,15
 mg/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,15 mg/l), H_3BO_3 (0,05 mg/l), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot$
 $2 \text{H}_2\text{O}$ (0,055 mg/l), KI (0,1 mg/l).

pH säädettiin arvoon 6,8. Kasvualustaa steriloidtiin 20 minuuttia 120 °C:ssa.

Vitamiiniliuoskoostumus sisältää:

biotinia (0,002 mg/l), kalsiumpantotenaattia (0,4 mg/l),
 inositolia (2,0 mg/l), nikotiinihappoa (0,4 mg/l), tiamiini-
 HCl :ää (0,4 mg/l), pyridoksiini- HCl :ää (0,4 mg/l), p-amino-
 bentsoehappoa (0,2 mg/l), riboflaviinia (0,2 mg/l), fooli-
 happoa (0,01 mg/l).

pH säädettiin arvoon 7,0 ja kasvatusalusta steriloidtiin käyttäen membraanisuodatusta.

Hiljattain löydetty mikro-organismit puhdistettiin agarilla jähmetetyllä kasvualustalla.

Esimerkkejä tällaisista viljelmistä on talletettu CBS:ään. Mikro-organismeihin, jotka hapettavat kaavan (II) mukaisen yhdisteen kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, ja jotka eristettiin ja valittiin edellä mainitulla menetelmällä, kuuluvat Graphium fructicola (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 256.86, 15.5.1986), Exophiala mansonii (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 257.86, 15.5.1986), Exophiala mansonii (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 259.86, 15.5.1986), Exophiala jeanselmei var. jeanselmei (tämän lajin kanta on tallennettu esimerkkinä CBS:ään talletusnumerolla 258.86, 15.5.1986) ja näiden muunnokset tai mutantit.

Määritelmän piiriin kuuluvat myös mikro-organismit, jotka ovat saaneet kyvyn stereoselektiiviseen hapetukseen siten, että niihin on liitetty vierasta geneettistä materiaalia. Tämä voidaan suorittaa siirtämällä kloonattu geeni, joka koodittaa polypeptidiä, esim. entsyymiä, joka saa aikaan stereoselektiivisen hapettumisen, sopivasta mikro-organis-
mista toiseen mikro-organismiin, erityisesti Escherichia coli. Muut tällaiset mikro-organismit voivat kuulua sukuihin Pseudomonas, Mycobacterium, Streptomyces, Saccharomyces, Kluyveromyces, Bacillus, Nocardia, Rhodococcus, Escherichia ja Corynebacterium. Kloonatut geenit voidaan selektoida sillä perusteella, että ne kykenevät hapettamaan kaavan (II) mukaisen yhdisteen stereoselektiivisesti.

Vaihtoehtoisesti ne voidaan selektoida sillä perusteella, että ne ristiinhybridisoituvat jo selektoidun geenin kanssa, joka koodaa stereoselektiivisen epoksidaation aikaansaavaa entsyymiä.

Mikro-organismit voidaan edullisesti immobilisoida esimerkiksi polymeerigeeliin. Tämä voidaan tehdä elävillä soluilla, tapetuilla soluilla ja/tai lepotilassa olevilla soluilla, tai sopivilla niistä peräisin olevilla entsyymeillä, jotka voidaan puhdistaa tiettyyn rajaan saakka, mikäli tarvitaan suurempaa spesifistä aktiivisuutta.

Siten ilmaisulla "mikro-organismit tai niistä peräisin olevat uutteen" tarkoitetaan mikro-organismeja, tapettuja, eläviä tai lepotilassa olevia, ja niiden uutteen, kuten entsyymejä tai metaboliitteja, mahdollisesti konsentroituna tai puhdistettuina. Voidaan käyttää esimerkiksi entsyymejä mahdollisesti yhdessä esim. keinotekoisien tai luonnollisten kofaktoreiden kanssa. Kaavan (II) mukaisen yhdisteen hapettamiseen ei mielellään käytetä fermentatiivisesti aktiivisia soluja. On havaittu, että elävistä tai tapetuista soluista peräisin olevat entsyymit voivat tuottaa S-isomeeriä sopi-

vissa olosuhteissa. Mikro-organismeja tai niistä peräisin olevia aineita voidaan käyttää useita kertoja. Mikro-organismit voivat pysyä aktiivisina myös ilman kosubstraattia (esim. glukoosia). Kaavan (I) mukaisen yhdisteen R-isomeerin rikastuminen voi tapahtua sopivissa puskureissa samoin kuin fysiologisissa suoloissa.

Tämän keksinnön erään edullisen suoritustavan mukaisesti mikro-organismia, jolla on kyky muuttaa kaavan (II) mukainen yhdiste kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, siten että siitä on ainakin 70 paino% S-konfiguraatiossa, voidaan viljellä noin 0,5 - 10 päivää. Tämän jälkeen solut voidaan suspendoida nestemäiseen ravintoalustaan, mieluummin minimaali-nestevä ravintoalustaan ja kaavan (II) mukainen yhdiste saatetaan kosketukseen solujen kanssa. Vaihtoehtoisesti solut voidaan tappaa, esimerkiksi suspendoida lyysoivaan alustaan ja 4-allyylioksifenyyliasetatti saatetaan kosketukseen soluista peräisin olevien aineiden kanssa. Kun edellä mainittu kasvatus on kestänyt 1-10 päivää, solut voidaan eristää viljelyalustasta ennen kuin ne suspendoidaan minimaali-nestevä ravintoalustaan tai lyysoivaan alustaan.

Kaavan (II) mukaisen yhdisteen selektiiviseen hapetukseen käytettävien mikro-organismien kasvattamiseen voidaan käyttää tavallisia viljelyalustoja, jotka sisältävät assimiloituvan hiililähteen (esimerkiksi glukoosia, laktaattia, sakkaroosia, jne.), typpilähteen (esimerkiksi ammoniumsulfattia, ammoniumnitraattia, ammoniumkloridia, jne.) yhdessä orgaanisen ravintolähteen (esimerkiksi hiivauutteen, mallasuutteen, peptonin, lihauutteen, jne.) kanssa ja epäorgaanisen ravintolähteen (esimerkiksi fosfaatin, magnesiumin, kaliumin, sinkin, raudan ja muiden metallien, joita on läsnä hivenainemääriä) kanssa. Edullinen kasvatusalusta on Czapek-Dox-, BHI- tai YEPD-kasvatusalusta, joka mahdollisesti on rikastettu yhdellä tai useammalla aineella.

Lämpötila pidetään mikro-organismien kasvatuksen aikana normaalisti välillä 0-45 °C ja pH välillä 3,5-8. Mieluimmin mikro-organismit kasvatetaan lämpötilassa, joka on 20-37 °C ja pH on mieluimmin 4-7.

Aerobiset olosuhteet, jotka tarvitaan mikro-organismien kasvun aikana, voidaan aikaansaada minkä tahansa hyvin tunnetun menetelmän mukaisesti edellyttäen, että lisättävän hapen määrä on riittävä tyydyttämään mikro-organismien metaboliset vaatimukset. Tämä tapahtuu kaikkein käytännöllisimmin syöttämällä happea, mieluimmin ilman muodossa. Kaavan (II) mukaisen yhdisteen muuttuessa kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, mikro-organismit voivat olla kasvuvaiheessa käytettäessä edellä mainittua, tavanomaista kasvatusalustaa. Mikro-organismeille voidaan lisätä kosubstraatti.

Kaavan (II) mukaisen yhdisteen muuttuessa kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi mikro-organismit voidaan pitää kasvavassa tilassa tai olennaisesti kasvamattomassa tilassa (non-growing stage) käyttämällä minimaali-kasvualustaa. Minimaali-kasvualustana voidaan käyttää tavallista kasvualustaa, joka sisältää tarvittaessa assimiloituvan hiililähteen (esim. glukoosia, laktaattia, sakkaroosia, jne.) tarvittaessa typpilähteen (esimerkiksi ammoniumsulfaattia, ammoniumnitraattia, ammoniumkloridia, jne.) tarvittaessa yhdessä orgaanisen ravintolähteen muodostavan aineen (esimerkiksi hiivauutteen, suolauutteen, peptonin, lihauutteen jne.) ja tarvittaessa epäorgaanisen ravintolähteen muodostavan aineen (esimerkiksi fosfaatin, magnesiumin, kaliumin, sinkin, raudan ja muiden metallien, joita on läsnä hivenainemääriä) kanssa. Mikro-organismit voidaan pitää kasvamattomassa tilassa esimerkiksi poistamalla assimiloituva hiililähde tai typpilähde. Tässä tilassa lämpötila pidetään välillä 0-45 °C ja pH välillä 3,5-8. Mieluimmin mikro-organismit pidetään lämpötilassa, joka on 20-37 °C ja pH välillä 4-7. Aerobiset olosuhteet, jotka tarvitaan tämän tilan aikana, voidaan aikaansaada

edellä esitetyillä menetelmillä edellyttäen, että hapen li-
säys on riittävä paitsi mikro-organismien metabolisen tar-
peen tyydyttämiseksi myös kaavan (II) mukaisen yhdisteen
muuttamiseksi kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi. Kaavan (I)
mukainen yhdiste, jota edellä mainitut mikro-organismit
tuottavat, voidaan ottaa talteen ja puhdistaa minkä tahansa
tällaisille yhdisteille tunnettujen menetelmien mukaisesti.
Edullisesti muutettava substraatti (kaavan II mukainen yh-
diste) lisätään kasvavaan tai kasvatettuun viljelmään ja in-
kuboidaan vielä 5 tuntia - 10 päivää.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä, kuitenkin keksinnön
piiriä rajoittamatta.

Esimerkki I

2-(6-metoksi-2-naftyyli)-heptaanin konversio S-2-(6-metoksi-
2-naftyyli)propaanihapoksi (S-naprokseeni) käyttäen sienii

Sienet pidettiin agarmaljoilla tai pakastettuna 50%:isessa
glyserolissa. Kokeita varten ne joko ympätettiin suoraan mää-
ritysalustaan tai esikasvatettiin YEPD-alustassa 30 °C:ssa.
Kun esikasvatus suoritettiin, organismeja kasvatettiin kun-
nes saavutettiin täydellinen kasvu, jonka jälkeen 2-10 %
viljelmästä ympätettiin tuoreeseen määritysalustaan.

YEPD-alusta sisältää: Bactopeptonia 20 g/l, hiivauutetta 10
g/l ja glukosia 20 g/l. pH säädettiin arvoon 7,0. Alustaa
steriloitiin 30 minuuttia 110 °C:ssa.

Kutakin määritystä varten käytettiin 100 ml 500 ml:n pullos-
sa pidettyä YEPD-alustaa. Kaikki määritykset tehtiin ainakin
kahtena rinnakkaisena. Koko ajan käytettiin hiivan kaltai-
sille sienille tarkoitettuja ravistelupulloja (baffle
flasks). Rihmamaiset sienet kasvatettiin tavallisissa pul-
loissa ja siirrettiin ravistelupulloihin samalla kun 2-(6-
metoksi-2-naftyyli)-heptaani lisättiin.

Organismien annettiin kasvaa 48 tuntia. Sen jälkeen viljelmiin lisättiin 40 µl 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-heptaania. Viljelmiä inkuboitiin edelleen 1 tai 3 päivää 30 °C:ssa ja uutettiin sitten 40 ml:lla dikloorimetaania, kun oli hapotettu pH 2,0:aan H₃PO₄:llä ja lisätty pieni määrä ammoniumsulfaattia.

Uutteet analysoitiin HPLC:llä, käyttäen pihappogeeli-chrompack-kolonnia (CP-Sper-Si), eluoitiin etyyliasetatti/iso-oktaanilla (1:7), hapotettiin 3,5 ml:lla/litra muura-haishappoa.

Uutteet, jotka sisälsivät saman retentioajan omaavia yhdisteitä kuin naprokseeni, käytettiin johdannaista valmistettaessa. Läsnaoleva naprokseeni muutettiin naftaleeni-metyyliamiinijohdannaiseksi sen enantiomeerisen puhtauden määrittämiseksi.

Johdannaisen valmistaminen ja enantiomeerien erottaminen

8-12 ml:n dikloorimetaaniuute haihdutettiin vakiossa typpi-virrassa 60 °C:ssa. Kuivattu näyte otettiin 2 ml:aan dikloorimetaania ja sen annettiin reagoida 10 minuuttia 60 °C:ssa 200 µl:n kanssa liuosta, jossa oli 2-bromi-1-metyylipyridiini-jodidia liuotettuna dimetyyli-formamidiin (50 mg/ml) ja 200 µl:n kanssa liuosta, jossa oli 1-naftaleeni-metyyliamiinia liuotettuna CH₂Cl₂:een (100 mg/ml).

Reaktioseos kuivattiin typen alla 60 °C:ssa. Jäännös liuotettiin sitten ensin 2 ml:aan iso-oktaani/CH₂Cl₂:a (2:1 til/til) ja uutettiin, kun oli lisätty 2 ml 1 N HCl. Orgaaninen kerros analysoitiin sitten HPLC:llä käyttäen kiraalisesta DNBPG-kolonnia, eluoitiin iso-oktaani/kloroformi/metanolilla (90/7/3 til/til).

Tulokset on esitetty taulukossa I.

Taulukko I

Mikro-organismi	Aika substraatin lisäämisestä (päiviä)	Muodostunut naprokseeni* (mg/l)	%S	%R
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 257.86)	1	4,5	74	26
	3	5,7	78	22
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 259.86)	3	9,5	73	27
<u>Exophiala jeanselmei</u> <u>var. jeanselmei</u> (CBS 258.86)	1	8,4**	83**	17**
	3	18	99	1
<u>Graphium fructicola</u> (CBS 256.86)	3	6,8	86	14
<u>Exophiala jeanselmei</u> (CBS 537.76)	1	10	90	10
	3	16	98	2
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 101.67)	1	11	86	14
	3	17	82	18
<u>Exophiala jeanselmei</u> <u>var. heteromorpha</u> (CBS 232.33)	3	2,0	90	10
<u>Rhinocladiella</u> <u>spinifera</u> (CBS 269.28)	3	0,8	100	--

* Arvo on johdannaisen valmistamisen jälkeen havaittu naprokseenin määrä. Kukin arvo tarkoittaa kahden saadun arvon keskiarvoa. Ainoastaan kahdella tähdellä ** merkityt arvot ovat tuloksia yhdestä kokeesta.

Esimerkki II

2-(6-metoksi-2-naftyyli)-pentaanin konversio S-2-(6-metoksi-2-naftyyli)propaanihapoksi (S-naprokseeni) käyttäen sienä.

Kaikki kokeet suoritettiin kuten on esitetty esimerkissä I, mutta viljelmiin lisättiin 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-heptaanin sijasta nyt 40 μ l 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-pentaania.

Tulokset on esitetty taulukossa II.

Taulukko II

Mikro-organismi	Aika substraatin lisäämisestä (päiviä)	Muodostunut naprokseeni* (mg/l)	%S	%R
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 257.86)	3	11	75	25
<u>Exophiala jeanselmei</u> <u>var. jeanselmei</u> (CBS 258.86)	3	4,1	100	-
<u>Graphium fructicola</u> (CBS 256.86)	3	6,2	85	15
<u>Exophiala dermatides</u> (CBS 207.35)	3	6,1	71	29
<u>Exophiala jeanselmei</u> (CBS 537.76)	3	21	98	2
<u>Exophiala alcalophila</u> (CBS 520.82)	3	3,1	79	21
<u>Rhinocladella</u> <u>spinifera</u> (CBS 269.28)	3	0,6	100	--

* Arvo on johdannaisen valmistamisen jälkeen havaittu naprokseenin määrä. Kukin arvo tarkoittaa kahden saadun arvon keskiarvoa.

Esimerkki III

2-(6-metoksi-2-naftyyli)-nonaanin konversio S-2-(6-metoksi-2-naftyyli)propanihapoksi (S-naprokseeni) käyttäen sieniä.

Kaikki kokeet suoritettiin kuten esimerkissä I on esitetty, mutta viljelmiin lisättiin 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-heptaanin sijasta nyt 40 μ l 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-nonaania.

Tulokset on esitetty taulukossa III.

Taulukko III

Mikro-organismi	Aika substraatin lisäämisestä (päiviä)	Muodostunut naprokseeni* (mg/l)	%S	%R
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 257.86)	3	27,6	80	20
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 259.86)	3	22,5	70	30
<u>Exophiala jeanselmei</u> <u>var. jeanselmei</u> (CBS 258.86)	3	10,8	100	-
<u>Graphium fructicola</u> (CBS 256.86)	3	9,3	73	27
<u>Exophiala jeanselmei</u> (CBS 537.76)	3	25**	93**	7**
<u>Exophiala alcalophila</u> (CBS 520.82)	3	2,1**	86**	14**
<u>Exophiala mansonii</u> (CBS 101.67)	3	2,5	81	19
<u>Rhinocycladiella</u> <u>spinifera</u> (CBS 269.28)	3	1,0	100	--

* Arvo on johdannaisen valmistamisen jälkeen havaittu naprokseenin määrä. Kukin arvo tarkoittaa kahden saadun arvon keskiarvoa. Ainoastaan kahdella tähdellä ** merkityt arvot ovat tuloksia yhdestä kokeesta.

Esimerkki IV

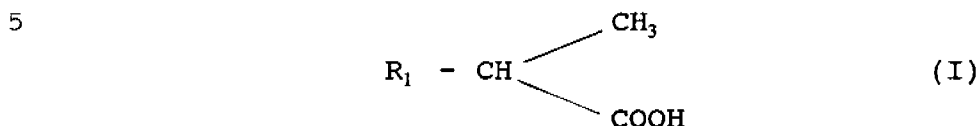
Exophiala jeanselmei var. jeanselmei-sienen (CBS 258.86)
avulla muodostetun S-2-(6-metoksi-2-naftyyli)-propaanihapon
(S-naprokseeni) eristäminen ja identifiointi

500 ml YEPD-kasvualustassa kasvatettua Exophiala jeanselmei var. jeanselmei-viljelmää (CBS 258.86), jossa 2-(6-metoksi-2-naftyyli)-heptaani oli muutettu naprokseeniksi, kuten esimerkissä I on esitetty, käytettiin muodostuneen naprokseenin eristämiseen ja identifiointiin. Viljelyliemi hapotettiin ja uutettiin useita kertoja CH_2Cl_2 :lla. Kun CH_2Cl_2 oli haihdutettu, jäi 0,16 g:n jäännös. Jäännös liuotettiin 10 ml:aan dietyylieetteriä ja uutettiin 3 x 5 ml:lla 1M NaHCO_3 :a. Vesifaasi hapotettiin ja uutettiin uudelleen 3 x 5 ml:lla dietyylieetteriä. Kun orgaaninen kerros oli pesty 30%:isella NaCl :lla, uute kuivattiin Na_2SO_4 :n päällä ja kun dietyylieetteri oli haihdutettu, jäljelle jäi 20 mg:n raaka-jäännös. Jäännös analysoitiin pmr:llä ja naprokseenille, joka oli yksi läsnäolevista yhdisteistä, havaittiin seuraavat karakteristiset signaalit:

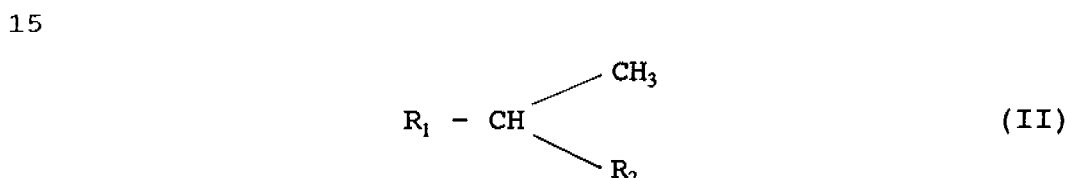
$\delta 1,59$ ppm (dupletti, 3H, kytkentävakio 7 H_2)
 $\delta 3,91$ ppm (singletti, 3H oCH_3 :sta)
 $\delta 7,12$ ppm (multipletti, 2H naftyylistä)
 $\delta 7,42$ ppm (kaksoisdupletti, 1H naftyylistä)
 $\delta 7,70$ ppm (multipletti, 3H naftyylistä)

Patenttivaatimukset

1. Stereospesifinen menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen



josta yhdisteestä ainakin 70 paino-% on S-konfiguraatiossa,
 10 tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin valmistamiseksi, jossa kaavassa R₁ tarkoittaa mahdollisesti substituoitua aryyli- tai naftyyli-ryhmää, kuten fenyyli- tai naftyyli-ryhmää, t u n n e t t u siitä, että kaavan (II) mukainen yhdiste



20 jossa R₁ tarkoittaa samaa kuin edellä ja R₂ on 3-11 hiiliatomia sisältävä lineaarinen alkyyliryhmä, saatetaan mikro-organismin, joka on hiiva tai sieni, tai siitä peräisin olevien uutteiden vaikutuksen alaiseksi, joilla on kyky stereoselektiivisesti hapettaa kaavan (II) mukainen
 25 yhdiste kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, josta on ainakin 70 paino-% S-konfiguraatiossa, ja kaavan (I) mukainen yhdiste muutetaan haluttaessa sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi.

30 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan (I) mukainen yhdiste on naprokseeni.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu mikro-organismi tai siitä peräisin olevat uutteet kykenevät muuntamaan kaavan (II)

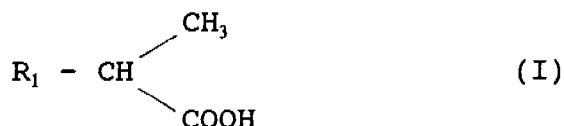
mukaisen yhdisteen kaavan (I) mukaiseksi yhdisteeksi, josta ainakin 90 paino-% on S-konfiguraatiossa.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että mainittu mikro-organismi tai siitä peräisin olevat uutteen on eristetty ja selektoitu luonnollisista lähteistä käyttäen 2-(R₁)-alkaania hiililähteenä sopivassa kasvualustassa.
- 10 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että R₁ tarkoittaa 6-metoksi-2-naftyyyliryhmää ja alkaani on pentaani, heptaani tai nonaani.
- 15 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että mainittu mikro-organismi kuuluu Graphium-sukuun.
- 20 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että mainittu mikro-organismi kuuluu Exophiala-sukuun.
- 25 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että mainittu mikro-organismi kuuluu Rhinocla-
diella-sukuun.

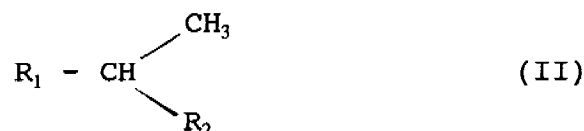
Patentkrav

1. Ett stereospecifikt förfarande för framställning av en förening med formeln I

5



10 av vilken förening åtminstone 70 vikt-% är i S-konfiguration, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt eller ester därav, i vilken formel R_1 betecknar en eventuellt substituerad arylgrupp, såsom en fenyl- eller naftylgrupp, k ä n n e t e c k n a t därav, att en förening med formeln
15 (II)



20 i vilken R_1 betecknar detsamma som ovan och R_2 är en linear alkylgrupp med 3-11 kolatomer, bringas under inverkan av en mikroorganism, som är jäst eller svamp, eller ^{ett} extrakt härstammande därur, som förmår stereoselektivt oxidera en förening med formeln (II) till en förening med formeln (I)
25 med åtminstone 70 vikt-% i S-konfiguration, och, om så önskas, en förening med formeln (I) omvandlas till ett farmaceutiskt godtagbart salt eller ester därav.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
30 n a t därav, att föreningen med formeln (I) är naproxen.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den nämnda mikroorganismen eller extraktet härstammande därur förmår omvandla en förening
35 med formeln (II) till en förening med formeln (I) med åtminstone 90 vikt-% i S-konfiguration.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att den nämnda mikroorganismen eller extraktet härstammande därur har isolerats och selekterats från naturkällor genom att använda en 2-(R₁)-alkan såsom kolkälla i ett lämpligt växtmedium.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att R₁ betecknar en 6-metoxi-2-naftylgrupp och alkanen är pentan, heptan eller nonan.

10

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den nämnda mikroorganismen tillhör släkten [†]Graphium.

15 7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den nämnda mikroorganismen tillhör släkten [†]Exophiala.

20 8. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den nämnda mikroorganismen tillhör släkten [†]Rhinocladiella.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB H - 2 160 866 (C 12 P 7/40)

NO _____

SE _____

US P - 4 028 182 (C 12 B 1/00)

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron K ja P.

EP H - 98 533 (C12P 7/26)
H - 103 887 (C12N 15/00)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts 102 (1984) 22737x