

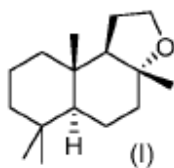
## FORMA SÓLIDA DE (-)-AMBROX FORMADA POR UNA BICONVERSIÓN DE HOMOFARNESOL EN PRESENCIA DE UN BIOCATALIZADOR

### Campo de la Invención

5 La presente invención se relaciona con una forma sólida de (-)-Ambrox, así como con métodos de preparación y purificación del mismo.

### Antecedentes de la Invención

AMBROFIX™ es el nombre comercial de Givaudan patentado de (-)  
10 )-Ambrox que tiene la fórmula general (I):



AMBROFIX™ es una molécula muy importante en la gama de  
15 ingredientes de los perfumistas. Ofrece una nota ámbar altamente poderosa, altamente sustantiva y altamente estable para su uso en todas las aplicaciones de perfumería. AMBROFIX™, disponible en Givaudan, es el material más adecuado para obtener una auténtica nota de olor ámbar gris.

20 En la actualidad AMBROFIX™, como es el caso con otras formas comerciales de (-)-Ambrox, se produce por química sintética a partir de materiales de partida origen natural. La disponibilidad y la calidad de ciertos materiales de partida son dependientes de las condiciones climáticas, así  
25 como de factores socioeconómicos. Además, puesto que los

materiales de partida pueden ser extraídos de los recursos naturales, con rendimientos modestos, están disponibles a precios que, con toda probabilidad, hacen cada vez más su uso no económico a escala industrial. En consecuencia, si los  
5 suministros industriales comerciales de AMBROFIX™ son continuar para estar disponibles a un costo razonable, hay una necesidad de un proceso más rentable de producción y purificación, el cual sea capaz de industrialización.

Una ruta biotecnológica industrial escalable en (-)-  
10 Ambrox sería atractiva debido a que es potencialmente menos compleja, más ecológica y ambientalmente amigable que los procedimientos de química completamente sintéticos.

Un sustrato potencialmente útil en el que intentar una bioconversión para proporcionar (-)-Ambrox es el  
15 homofarnesol. En su artículo seminal, Neumann *et al* (Biol. Chem. Hoppe-Seyler Vol. 367, pp. 723-726 (1986)), examinaron la viabilidad de convertir homofarnesol a (-)-Ambrox bajo catálisis enzimática, empleando la enzima escualeno hopeno ciclasa (SHC). El homofarnesol empleado fue una mezcla de los  
20 cuatro isómeros geométricos de esta molécula. De los cuatro isómeros, sólo el isómero geométrico 7E,3E (usando la nomenclatura convencional) podría ciclarse, y sólo con un rendimiento muy bajo del (-)-Ambrox deseado.

JP 2009-60799 (Kao) describe una síntesis mediante la  
25 cual SHC actúa sobre un sustrato homofarnesol para producir

(-)-Ambrox. El sustrato es una mezcla de los cuatro isómeros geométricos (3Z,7Z; 3E,7Z; 3Z,7E y 3E,7E). El documento sólo describe la preparación de (-)-Ambrox a partir de homofarnesol usando extractos líquidos que contienen SHC  
5 preparado a partir de un microorganismo recombinante que expresa el gen de SHC. La mezcla de homofarnesol se convierte a (-)-Ambrox y su estereoisómero 9-epi, y la purificación puede llevarse a cabo por destilación o por cromatografía de columna. Kao no describe un proceso por el cual homofarnesol  
10 se convierte en (-)-Ambrox usando sustancialmente todo o microorganismos intactos que producen SHC, y además, no proporciona ninguna enseñanza técnica relacionada con el procesamiento corriente abajo de las mezclas de reacción complejas obtenidas por tales procesos que pueden producir (-)  
15 )-Ambrox en la forma olfativamente pura.

Para el conocimiento del solicitante, la técnica anterior no describe ningún proceso viable, industrialmente escalable, que involucra la bioconversión catalizada por SHC de homofarnesol, para proporcionar (-)-Ambrox en la forma  
20 olfativamente pura.

Además, si bioconversión de homofarnesol ha de realizarse a escala industrial, deben estar disponibles fuentes de costo eficiente de 3E,7E-homofarnesol altamente puras. Sin embargo, aunque las rutas de síntesis en  
25 homofarnesol se han descrito en la literatura (ver, por

ejemplo, US 2013/0273619), para el conocimiento del solicitante, no hay fuentes escala industrial rentables de 7E,3E-homofarnesol puro actualmente disponibles.

5 Sigue habiendo una necesidad para proporcionar una ruta factible económica e industrialmente escalable en el ingrediente de fragancia valioso (-)-Ambrox.

En las solicitudes de patente co-pendiente PCT/EP2014/072891 (publicada como WO 2015/059293) y PCT/EP2014/072882 (publicada como WO 2015/059290), el solicitante describe un método eficiente de preparación de la mezcla de 7E,3E/Z-homofarnesol que se enriquece en el isómero geométrico 7E,3E. La mezcla de homofarnesol 7E,3E/Z se prepara a partir de beta-farneseno, y la información isomérica contenida en este material de partida se conserva, de manera que el doble enlace homofarnesol en la posición 7 se fija en la configuración E. Sin embargo, incluso esta química elegante todavía resulta en una mezcla de isómeros 3E/Z. 7E,3E-homofarnesol puro permanece sintéticamente un reto, y sólo podría lograrse por medio de purificación económicamente desventajosa de mezclas isoméricas.

A pesar de los desarrollos relacionados con la producción biocatalítica de (-)-Ambrox de homofarnesol, sigue habiendo una necesidad de proporcionar medios eficientes para la separación y purificación de (-)-Ambrox de los medios de bioconversión que contiene material particulado y otros

materiales, por ejemplo, los desechos de células, así como posibles subproductos, sustrato sin reaccionar y cualquier solvente u otros reactivos empleados en el proceso de bioconversión.

5

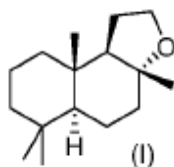
### **Breve Descripción de la Invención**

Al abordar las deficiencias en la técnica anterior, el solicitante encontró sorprendentemente que una forma cristalina de (-)-Ambrox se puede formar en un proceso biocatalítico. Más particularmente, el solicitante encontró  
10 que los cristales de (-)-Ambrox se forman en el medio de bioconversión.

La manera sorprendente e inesperada en la que (-)-Ambrox cristaliza en un medio de bioconversión, así como las características físicas de los cristales que se forman es  
15 particularmente relevante en términos del aislamiento y purificación desde un medio de bioconversión, de una forma esencialmente incolora y olfativamente pura de (-)-Ambrox que exhibe una auténtica nota de olor a ámbar gris. En el caso de que el biocatalizador sea un biocatalizador microbiano,  
20 entonces el descubrimiento de que (-)-Ambrox obtenido en una calidad olfativamente pura es particularmente sorprendente desde el punto de vista del hecho de que biocatalizadores microbianos presentes en el medio de bioconversión pueden tener características de notas altamente desagradables e  
25 incluso ofensivas. El descubrimiento sorprendente de que los

cristales de (-)-Ambrox se forman externos de los catalizadores microbianos en un medio de bioconversión permite una separación particularmente eficiente de (-)-Ambrox de un medio de olor fétido.

5 Por consiguiente, la invención proporciona, en un primer aspecto, una forma sólida del compuesto de la fórmula (I):



10 en donde la forma sólida se caracteriza por al menos una de las siguientes características:

exhibe un patrón de difracción de polvo de rayos x que tiene por lo menos uno de los siguientes picos a ángulos de difracción  $2\theta$  de aproximadamente 15.6, 16.2, 16.7, 17.0, 15 17.4, 18.3  $\pm$  0.2°;

comprende cristales alargados que tienen un diámetro promedio de entre 10 a 400 micrómetros, más particularmente de 40 a 400, y aún más particularmente de 100 a 400 medido por granulometría láser;

20 comprende cristales alargados que tienen una longitud medida a lo largo de su dimensión más larga de 20 a 600 micrómetros, más particularmente de 40 a 500, y aún más particularmente de 100 a 400, de preferencia mayor que 100, más particularmente mayor que 200, y aún más particularmente 25 mayor que 300 micrómetros, medido por granulometría láser; y

es sustancialmente incoloro, como se define por tal término, en la presente a continuación.

En una modalidad más particular, la forma sólida del compuesto de la fórmula (I) se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos x que exhibe los siguientes  
5 picos a ángulos de difracción  $2\theta$  de aproximadamente 15.6, 16.2, 16.7, 17.0, 17.4 y 18.3  $\pm$  0.2°.

En una modalidad aún más particular, la forma sólida del compuesto de la fórmula (I) se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos x sustancialmente como se  
10 representa en la Figura 1, a continuación.

Una forma sólida de (-)-Ambrox formada por un proceso biocatalítico no ha sido ni descrita ni sugerida hasta ahora en la técnica anterior, para el mejor conocimiento del  
15 solicitante.

Por consiguiente, la invención proporciona en otro de sus aspectos una forma sólida de un producto de bioconversión acuerdo con la fórmula (I).

En una modalidad de la invención, la forma sólida de un  
20 producto de bioconversión de acuerdo con la fórmula (I) tiene por lo menos una de las características que caracterizan denominas en la presente anteriormente.

Los datos de difracción de rayos x de polvo que se hace referencia anteriormente, pueden ser colectados de una manera  
25 directa usando el equipo de difractómetro bien conocido en la

técnica. La metodología y la instrumentación usada para medir los patrones de difracción de rayos x en polvo referidos en la presente se describen con más detalle en los Ejemplos.

La forma de los cristales se determinó por microscopía  
5 de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica, y que no requieren más elaboración en la presente.

El tamaño característico y la forma de los cristales individuales obtenidos de acuerdo con la presente invención se muestran en la Figura 2, a continuación.

10 Las mediciones de diámetro promedio de los cristales se determinaron por granulometría láser. La granulometría láser es una técnica bien conocida en la literatura. El tamaño de partícula promedio se puede determinar en cualquier analizador de tamaño de partícula conocida para tal  
15 propósito, por ejemplo un instrumento CILAS 1180 No. 516. Las mediciones pueden realizarse de conformidad con la norma ISO 13320-1 (revisión 2009) usando el método de Fraunhofer con agua como líquido portador y un índice de oscurecimiento de 24.

20 Como se estableció anteriormente, el hecho de que (-)- Ambrox aparece en la forma cristalina en un medio de bioconversión, así como las características físicas de los cristales, es decir, su tamaño y densidad, es particularmente relevante en términos de la eficiencia de aislamiento de (-)-  
25 Ambrox y en última instancia su claridad y pureza olfativa.

Más específicamente, fue posible separar eficientemente los cristales del medio de bioconversión incluyendo el material particulado, por ejemplo, residuos celulares, así como cualesquiera subproductos, impurezas y similares, por  
5 medio de una etapa de separación de tamaño, esto es, una etapa de separación que explota las características físicas de los cristales, tales como tamaño, forma y/o densidad, más específicamente una etapa de filtración o decantación.

Además, la separación eficiente de los cristales no sólo  
10 de partículas y otro material, sino también de un medio de bioconversión multi-componente altamente coloreado también permite el aislamiento de (-)-Ambrox de impurezas, incluyendo cualquier subproducto que se puede formar, que puede incluir isómeros estructurales (constitucionales) y estereoisómeros,  
15 tales como los estereoisómeros o constitucionales denominados en la presente a continuación como compuestos (II), (III) y (IV), que a diferencia de (-)-Ambrox no cristalizan en el medio de bioconversión.

De esta manera, como resultado de la manera en que (-)-  
20 Ambrox cristaliza, así como la etapa de separación de tamaño permite al solicitante obtener (-)-Ambrox como un producto esencialmente incoloro y olfativamente puro.

Por consiguiente, la invención proporciona, en otro de sus aspectos, un método para preparar una forma sólida de (-)  
25 - Ambrox, en donde el método comprende las etapas de:

I) formar (-)-Ambrox cristalino en un medio de bioconversión por medio de un procedimiento biocatalítico; y

II) separar el (-)-Ambrox cristalino del medio de bioconversión.

5 El medio de bioconversión, del que el (-)-Ambrox cristalino se puede separar por medio de la presente invención, puede contener todo tipo de impurezas, tales como material particulado, subproductos, y similares. En particular, cuando la bioconversión se lleva a cabo usando un  
10 biocatalizador microbiano, el (-)-Ambrox cristalino puede separarse de un medio de bioconversión que contiene las células y los residuos celulares.

En una modalidad particular de la invención, la etapa de separación es una etapa de separación de tamaño que permite  
15 la separación no sólo del material cristalino de la fase líquida o fases, sino que también permite la separación de los cristales de cualquier material particulado, tales como células o residuos celulares, debido a las características físicas de los cristales, tales como su tamaño, forma y/o  
20 densidad.

En una modalidad más particular, la etapa de separación de tamaño es una etapa de filtración, una etapa de decantación, o una combinación de filtración y decantación.

Alternativamente o además de la filtración y/o  
25 decantación, el (-)-Ambrox también puede ser granulado. De

preferencia, los cristales de (-)-Ambrox se funden antes de la filtración y/o decantación y/o de peletización.

En una modalidad particular de la invención, antes de la etapa de separación ii), el medio de bioconversión se puede  
5 calentar para fundir los cristales de (-)-Ambrox, antes de enfriamiento gradual para permitir que el (-)-Ambrox cristalice nuevamente. Para este propósito, el medio de bioconversión se puede calentar a una temperatura de por lo menos 55°C. El calentamiento puede llevarse a cabo  
10 gradualmente durante un periodo que varía de aproximadamente 15 minutos hasta aproximadamente 2 horas, antes de enfriar lentamente a una temperatura de aproximadamente 20°C o menor, por ejemplo a 4°C, a una velocidad de unos pocos grados por hora, más particularmente de aproximadamente 5°C por hora.  
15 Después de este enfriamiento, el medio de bioconversión puede mantenerse a 4°C durante 8 horas.

La etapa de recristalización permite que se formen cristales más uniformes y más grandes, lo que ayuda a mejorar aún más la eficiencia de la etapa de separación.

20 Se encontró sorprendentemente que la adición de una sal al medio de bioconversión antes de la recristalización ayudó al crecimiento cristalino, el cual aumentó aún más el tamaño de los cristales, y creó una distribución más uniforme del tamaño de cristal. Las sales particulares incluyen sales  
25 inorgánicas, y en particular, cloruro de calcio, cloruro de

sodio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio y cloruro de litio.

El aumento de tamaño y uniformidad mejorada de los cristales pueden facilitar la etapa de separación de tamaño  
5 subsecuente, ya que se eliminan los cristales más pequeños o rotos que se formaron durante el proceso de bioconversión.

La etapa de separación de tamaño se puede llevar a cabo mediante filtración, empleando un filtro que tiene un tamaño de malla que es suficientemente grande para permitir que el  
10 material particulado contenido en el medio de bioconversión, por ejemplo, células y residuos celulares, pase a través del filtro con el filtrado, mientras que es suficientemente pequeño para capturar la totalidad o sustancialmente todos, los cristales de (-)-Ambrox como el retenido.

15 Los cristales de (-)-Ambrox se pueden filtrar sobre un lecho filtrante adecuado que tiene un tamaño de malla que se encuentra entre 10 a 100 micrómetros o más grande, de preferencia mayor que aproximadamente 50 micrómetros, 60 micrómetros, 70 micrómetros, 80 micrómetros, 90 micrómetros ó  
20 100 micrómetros.

Con respecto a los medios por los cuales se realiza la filtración, puede emplearse cualquiera de las técnicas y equipos de filtración conocidos. Sin embargo, la preferencia se otorga a las técnicas que son industrialmente escalables.  
25 La filtración centrífuga es particularmente adecuada para

este respecto.

Los aparatos de centrífuga de filtro son ampliamente conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, el capítulo 1 de "Separation and Purification Techniques in Biotechnology" por Frederick J. Dechow Noves; Publicaciones ISBN No. 0-8155-1197-3. El aparato puede ser cualquier variante del mismo, que incluye una centrífuga de placa de separación, o una centrífuga de tipo cilindro.

Es posible llevar a cabo la etapa de filtración en una centrífuga de tamiz continuo, tal como un aparato Siebtechnik H250. Tamaño de malla puede ser de cualquier tamaño que se refiere anteriormente en la presente, y en particular, de aproximadamente 100 micrómetros o mayor. Habiendo considerado la eficiencia del proceso de filtración, la centrífuga puede ser operada entre 500 y 2500 g, y más particularmente de aproximadamente 2000 g, aún más particularmente 2028 g. La velocidad a la que se alimenta el medio de bioconversión en la centrífuga se puede optimizar para proporcionar la filtración más eficiente posible, y puede incluir una velocidad de 300 a 800 kg/hora, y más particularmente de aproximadamente 400 kg/hora, aún más particularmente aproximadamente 430 kg/hora.

Alternativamente, la etapa de separación de tamaño se puede llevar a cabo por medio de una etapa de decantación.

En un proceso de decantación, el medio de bioconversión

se alimenta en el aparato de decantación adecuado y se somete el mismo a la aceleración por gravitación. De acuerdo con la ley de Stoke, el material particulado más pequeño y menos denso en el medio de bioconversión, por ejemplo, células o  
5 residuos celulares, se mantiene en suspensión en un sobrenadante que contiene otras impurezas del proceso de bioconversión, mientras que los cristales relativamente grandes y densos de (-)-Ambrox sedimentan como un sedimento en una cama proporcionada para ello. La separación puede  
10 llevarse a cabo de forma estática, o puede ser facilitada sometiendo el medio de bioconversión a una fuerza de hasta 6000 g, más particularmente de aproximadamente 500 a 1500 g, y aún más particularmente de aproximadamente 1000 g, y aún más particularmente 1170 g.

15 El sobrenadante puede extraerse y desecharse, o alternativamente someterse a otras etapas de decantación para separar y recuperar cualquier (-)-Ambrox cristalino que permaneció en el sobrenadante.

Los aparatos de decantación son generalmente conocidos  
20 en la técnica. Un aparato particular que es adecuado para uso en la presente invención es un Decantador Guinard, por ejemplo un modelo D1LC20HC. El medio de bioconversión puede alimentarse en el aparato a cualquier velocidad deseable optimizado para proporcionar un rendimiento eficiente, por  
25 ejemplo, de hasta 500 kg/hora y más particularmente de

aproximadamente 300 a 400 kg/hora.

La filtración y decantación pueden emplearse individualmente como etapas en el proceso de separación de tamaño de partícula, o puede usarse una combinación de etapas  
5 filtración y decantación. Los cristales de (-)-Ambrox separados del medio de reacción, de acuerdo con la etapa de separación de tamaño, se pueden lavar para eliminar cualquier material particulado residual, por ejemplo, células o  
residuos celulares, así como cualesquiera otras impurezas  
10 residuales, tales como subproductos, solventes, sustrato sin reaccionar y similares.

Los solventes útiles para lavar los cristales incluyen cualquier solvente en el que (-)-Ambrox es insoluble o muy poco soluble en la temperatura a la que la etapa de lavado se  
15 lleva a cabo. Más particularmente, (-)-Ambrox se considera insoluble o muy poco soluble en solventes en los que la solubilidad de (-)-Ambrox es 10% en peso o menos, a 5°C.

El lavado puede llevarse a cabo usando agua, solventes miscibles en agua o mezclas de los mismos. Los solventes  
20 miscibles en agua adecuados incluyen alcanoles inferiores, tal como etanol.

Más particularmente, los cristales se lavan con agua, por ejemplo 3 masas de agua para 1 masa de cristales. Pueden llevarse a cabo lavados múltiples.

25 Después del lavado, el filtrado o el sobrenadante como

el caso puede ser, puede ser desechado.

La recuperación de (-)-Ambrox puede lograrse mediante su eliminación mecánica del filtro o aparato decantador o filtro de banda (por ejemplo, modificaciones 7, 8, 9 y 20),  
5 colectarse y secarse. El (-)-Ambrox puede usarse en esta forma, sin purificación adicional o pulirse, en aplicaciones de perfumería.

Sin embargo, más típicamente, el (-)-Ambrox se puede disolver en un solvente y someterse a etapas de purificación  
10 adicionales, como se expone en más detalle a continuación, antes de ser empleado en la aplicación de perfumería.

El (-)-Ambrox obtenido de la etapa de separación se puede disolver en un solvente adecuado. Los solventes adecuados incluyen tolueno, o alcanoles inferiores, tales  
15 como etanol, por ejemplo, etanol al 96%.

La solución de (-)-Ambrox puede someterse a una etapa de filtración en un filtro que tiene un tamaño de malla adecuado para eliminar y separar cualquier material particulado residual, tales como células o residuos celulares del (-)-  
20 Ambrox que no podrían haber sido eliminados durante la etapa de separación de tamaño de partícula, y posterior lavado. Un tamaño de malla adecuado podría ser partiendo de entre 0.22 a 1 micrómetro y hasta 150 micrómetros. Cualesquiera técnicas de filtración y aparatos conocidos en la técnica que son  
25 adecuados para tal propósito, pueden emplearse de acuerdo con

la invención.

El etanol puede usarse para disolver los cristales. La cantidad de etanol usada es preferentemente la suficiente para disolver el (-)-Ambrox a aproximadamente 25°C, típicamente alrededor de 1 parte de cristal a 4 partes de etanol y la solución filtrarse sobre un filtro de 0.22 micrómetros (por ejemplo, KDS 15) a 1 bar de presión y temperatura ambiente. Además, finalmente puede ser filtrada sobre un filtro de 0.22 micrómetros como una etapa de filtración de pulido.

La filtración en esta etapa para eliminar cualquier material particulado restante, tales como células o residuos celulares, puede tener un efecto desodorante sobre (-)-Ambrox. Esto es porque las células residuales o residuos celulares pueden ser la causa de las notas desagradables no placenteras si permanece en el producto (-)-Ambrox terminado. La nota desagradable puede ser particularmente persistente debido a las propiedades de fijación de (-)-Ambrox, y por lo que su eliminación es particularmente importante para los propósitos de obtención de (-)-Ambrox olfativamente puro.

El (-)-Ambrox puede someterse a una etapa de blanqueo opcional para eliminar cualquier coloración residual que pudiera estar presente a pesar de la separación eficiente de los cristales del medio de bioconversión. Para las aplicaciones de fragancia, incluso (-)-Ambrox ligeramente

coloreado no es deseable como materia prima y, de esta manera, es particularmente importante clarificar (-)-Ambrox en la mayor medida posible si el producto va a ser valioso para aplicaciones de fragancia, y en particular, aplicaciones de fragancia finas o aplicaciones de cosméticos perfumados.

Para este propósito, una solución de los cristales de (-)-Ambrox solubilizados puede poner en contacto con un agente de blanqueo, tales como arcillas de montmorillonita activadas y/o carbón activado. Los agentes de blanqueo adecuados incluyen TONSIL FF, más particularmente TONSIL 412FF, y/o negro animal o Norit.

Opcionalmente, como una alternativa a la adición de un agente de blanqueo a una solución de (-)-Ambrox, la solución puede ser concentrada y el residuo sólido destilarse a presión reducida.

El agente de blanqueo se puede adicionar a una solución a reflujo (80 a 85°C) de (-)-Ambrox. Para este propósito, el agente blanqueador se puede adicionar como una suspensión en un solvente adecuado, tal como etanol. El contacto del agente de blanqueo y la solución puede ser durante un periodo de tiempo en el orden de 30 minutos. Posteriormente, el agente de blanqueo se elimina por filtración, por ejemplo, usando un filtro de 25 micrómetros.

Los agentes de blanqueo pueden no ser efectivos para reducir el color de mezclas de reacción altamente coloreadas,

y ciertamente no en la medida necesaria o adecuada para aplicaciones de perfumería. Sin embargo, debido al aislamiento eficiente y purificación de (-)-Ambrox del medio de bioconversión se describe en la presente, la solución de (-)-Ambrox ya es sustancialmente incolora, y la obtención del efecto de blanqueo deseado para esta solución es bastante menos difícil. Como resultado, es posible obtener una forma de (-)-Ambrox, a pesar de que es un producto de un proceso biocatalítico, el cual posee una ligereza deseable y el tono que se espera si el producto se va a emplear en aplicaciones de perfumería.

De acuerdo con el método de la presente invención, la solución de (-)-Ambrox desodorizada y decolorada se puede proporcionar en una forma sólida mediante la eliminación del solvente. La remoción del solvente puede efectuarse mediante re-cristalización o por evaporación. El (-)-Ambrox recuperado puede obtenerse en su forma re-cristalizada o como un residuo sólido, que se puede triturar, dependiendo de la manera en que la eliminación del solvente se lleva a cabo.

El solvente se puede eliminar por evaporación y el sólido residual se puede recuperar, por ejemplo mediante trituration, almacenarse y usarse en aplicaciones de perfumería.

Alternativamente, el sólido residual podría disolverse en un solvente de recristalización adecuado. Un solvente

adecuado para el propósito es un alcohol miscible con agua, tal como etanol, o mezclas de alcohol con agua. El solvente de recristalización se puede calentar a aproximadamente 75-80°C durante 15 minutos, antes de enfriamiento gradual a aproximadamente 10-15°C. Los cristales resultantes pueden ser recuperados por filtración y secarse, opcionalmente al vacío (por ejemplo 0.5 bar).

Como resultado del método de acuerdo con la presente invención, (-)-Ambrox puede obtenerse en forma sólida que es sustancialmente incolora y es olfativamente pura.

Por consiguiente, la invención proporciona en otro de sus aspectos, una forma sólida sustancialmente incolora de (-)-Ambrox, cuya forma sólida de (-)-Ambrox tiene un valor  $L^*$  de 90 o más; un valor  $a^*$  menor de 1 y mayor de -1; y un valor  $b^*$ , que es menor de 8, en donde los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  representan las coordenadas de cromaticidad del sistema CIELAB.

La forma sólida de (-)-Ambrox de acuerdo con la invención exhibe un alto grado de claridad o brillo y un bajo grado de amarillez. Esto es importante para aplicaciones de perfumería, y en particular para fragancia fina o perfumería destinadas para su uso en cosméticos, como la estética visual, así como olor son muy valoradas, y un producto perfumado no debe ser descolorido como consecuencia de la incorporación de un ingrediente de perfumería.

(-)-Ambrox, de acuerdo con la invención, tiene un valor  $L^*$  que indica la luminosidad de 90 o más y un valor  $b^*$  que indica la tonalidad azul-amarillo de 8 o menos. El valor  $L^*$  es preferentemente 92 o más, o incluso 93 o más. El valor  $b^*$  es preferentemente de 5 o menos, o incluso 4 o menos.

El valor  $L^*$  es un valor que especifica la ligereza de una sustancia y se indica por un valor entre 0 y 100. Un valor de  $L^*$  de 100 indica el estado más brillante (completamente blanco), y un valor de  $L^*$  de 0 indica el estado más oscuro (completamente negro).

El valor  $b^*$  especifica la tonalidad azul-amarillo de una sustancia. Cuanto mayor es el valor  $b^*$ , mayor es el grado de amarillez. Cuanto más pequeño es el valor  $b^*$ , mayor es el grado de coloración azul.

El valor  $L^*$  y el valor  $b^*$  pueden ser indicadas por las coordenadas de cromaticidad Lab de acuerdo con un método de indicación de diferencia de color. El valor  $L^*$  y el valor  $b^*$  se pueden medir usando cualquier espectrofotómetro comercialmente disponible adecuado, tal como el Minolta CM3500d.

El espectrofotómetro debería ser alimentado durante por lo menos una hora antes de tomar una medición. Un recipiente de vidrio previsto para ello debería ser llenado a la mitad con el producto sólido a medir teniendo cuidado de asegurar que el fondo del recipiente esté totalmente cubierto por el

producto. A continuación, el recipiente llenado se debe colocar en el soporte de la muestra prevista para ello. La clave de la muestra en el instrumento debe ser presionado y los valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  leerse fuera del panel de visualización.

Antes de tomar cualquier lectura, el instrumento debe ser calibrado para la reflexión cero y 100% mediante la colocación de objetos en blanco y negro proporcionados para ello en la ventana de los instrumentos de sensor óptico.

En una modalidad de la invención, la forma sólida de (-)-Ambrox es la forma cristalina caracterizada anteriormente.

En una modalidad de la invención, la forma sólida de (-)-Ambrox es un producto de bioconversión.

En una modalidad de la invención, la forma sólida de (-)-Ambrox es un producto de bioconversión formado de acuerdo con un proceso de bioconversión como se describe en la presente.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona una forma de (-)-Ambrox obtenida por un proceso biocatalítico como se describen en la presente.

En una modalidad más particular, el proceso biocatalítico es un proceso biocatalítico microbiano.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una forma de (-)-Ambrox definida en la presente, en aplicaciones de fragancia o sabor.

Los principios, los usos e implementaciones de la

presente invención se pueden ilustrar adicionalmente y entenderse con referencia a la descripción detallada adjunta y las Figuras. Antes de explicar una modalidad particular de la invención con más detalle, sin embargo, se entenderá que  
5 la invención no está limitada en sus principios a los detalles descritos a continuación.

### **Breve Descripción de las Figuras**

Para un mayor entendimiento de la presente invención, se hace referencia a las figuras que se acompañan, en las  
10 cuales:

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos x en el cual la escala de la abscisa está en grados 2-theta, y la ordenada es la intensidad en conteos.

La Figura 2 muestra una imagen microscópica de un solo  
15 cristal, que muestra claramente la forma alargada del cristal y una longitud a lo largo de su dimensión larga en exceso de 330 micrómetros (338.21 micrómetros).

La Figura 3 compara las cantidades relativas de (-)-Ambrox y sus isómeros (II), (III) y (IV) en un medio de  
20 bioconversión; un extracto de tolueno; la forma cristalina y el filtrado después de la colección del cristal.

La Figura 4 muestra un esquema de un proceso corriente abajo para producir (-)-Ambrox. El extracto de (-)-Ambrox obtenido puede someterse a etapas de desodorización o  
25 decoloración adicionales, como se describe en más detalle en

este documento a continuación.

La invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

### **Descripción Detallada de la Invención**

5 De acuerdo con la presente invención, una forma cristalina de (-)-Ambrox se obtiene por un proceso de bioconversión. La naturaleza precisa de la bioconversión (por ejemplo, la naturaleza del biocatalizador usado, el sustrato, las condiciones de reacción para la bioconversión del  
10 sustrato, y similares) no es crítica siempre que las condiciones sean tales como para permitir que el biocatalizador convierta el sustrato para producir (-)-Ambrox en una forma que cristaliza en el medio de bioconversión.

En una modalidad de la presente invención, un sustrato  
15 que consiste en una mezcla de 7E,3E/Z-homofarnesol se somete a un proceso de bioconversión, con lo que la mezcla de homofarnesol se cicla enzimáticamente en presencia de un microorganismo recombinante que expresa una enzima, en particular un biocatalizador de escualeno Hopeno ciclase  
20 (SHC) capaz de bioconvertir homofarnesol a (-)-Ambrox, para producir una mezcla de reacción de la que el (-)-Ambrox se puede aislar en una forma sustancialmente incolora y olfativamente pura con el procesamiento corriente abajo sorprendentemente eficaz.

25 En un aspecto de la invención, se proporciona la

ciclación catalizada por la enzima de homofarnesol para proporcionar una mezcla de reacción que comprende (-)-Ambrox, en donde el homofarnesol comprende una mezcla de isómeros geométricos 7E,3E/Z de homofarnesol, y en donde la reacción se lleva a cabo en presencia de un microorganismo recombinante que produce la enzima, más particularmente sustancialmente todo o intacto un microorganismo recombinante que produce la enzima.

La reacción de ciclación se lleva a cabo en presencia de un biocatalizador SHC capaz de bioconvertir homofarnesol a (-)-Ambrox.

El biocatalizador de SHC es una enzima de tipo salvaje o variante o es un microorganismo que expresa un gen que codifica la enzima SHC, de preferencia un microorganismo de *E. coli* recombinante. El biocatalizador de SHC se puede usar en cualquier forma, tal como, pero no se limita a, un enzima de SHC purificado, un extracto crudo que contiene una enzima SHC o una enzima SHC inmovilizada (por ejemplo, sobre un portador), o el biocatalizador puede ser un microorganismo que ha producido o que produce la enzima SHC, tal como una célula total recombinante intacta y/o célula fragmentada o una fracción que contiene la enzima SHC.

En una modalidad particular de la presente invención, la mezcla de homofarnesol se enriquece en el isómero geométrico 7E,3E.

En una modalidad más particular, la mezcla de homofarnesol es por lo menos 55/45 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una modalidad más particular, la mezcla de homofarnesol es por lo menos 70/30 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

5 En una modalidad más particular, la mezcla de homofarnesol es por lo menos 80/20 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una modalidad más particular, la mezcla de homofarnesol es por lo menos 90/10 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

10 En una modalidad aún más particular, la mezcla homofarnesol es por lo menos 95/5 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una modalidad particular de la presente invención, la mezcla de homofarnesol consiste de los isómeros geométricos 7E,3E/Z y no hay otros isómeros geométricos de homofarnesol.

La persona experimentada entiende que el término 7E, 7Z, 15 3E ó 3Z usado en conexión con homofarnesol se refiere, respectivamente, a la orientación del doble enlace en la posición 7 y posición 3 de homofarnesol. El compuesto de 7E,3E-homofarnesol tiene el No. CAS 459-89-2, mientras que el compuesto de 7E,3Z-homofarnesol tiene el No. CAS 138152-06-4. 20 El uso del término 7E,3E/Z-homofarnesol refiere a una mezcla de los compuestos.

Los métodos para la obtención de mezclas de homofarnesol útiles como sustrato en la reacción de ciclación de acuerdo con el método de la presente invención se exponen en las 25 solicitudes en co-pendientes PCT/EP2014/072891 (publicada

como WO 2015/059293) y PCT/EP2014/072882 (publicada como WO 2015/059290) antes mencionadas, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. En términos generales, describen una síntesis de mezclas de homofarnesol que procede mediante la conversión de farneseno, más particularmente alfa-farneseno y/o beta-farneseno, en su derivado de farneseno ciclopropanado correspondiente, usando una solución orgánica de una N-alquil-N-nitroso urea. El derivado ciclopropanado después se somete a reacciones de apertura de anillo y de rearreglo en presencia de un ácido de Brönsted para proporcionar la mezcla de homofarnesol, que es selectiva para el isómero geométrico 7E,3E. El uso de farneseno, como material de partida es particularmente preferido, ya que asegura que sea fijada la configuración E del doble enlace en la posición 7 de homofarnesol.

Las condiciones de reacción específicas, que forman las modalidades particulares de la presente invención, se exponen en las solicitudes co-pendientes, así como los ejemplos a continuación, y no requieren más elaboración en la presente.

La ciclación de homofarnesol para proporcionar una mezcla de reacción que contiene (-)-Ambrox puede ser catalizada por escualeno hopeno ciclasa (SHC). La SHC puede ser una enzima de tipo salvaje (por ejemplo, SEC ID No. 1), o una variante de la misma (por ejemplo, SEC ID No. 2, o No. SEO ID 4). La SHC se puede obtener de *Alicyclobacillus*

*acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*), *Zymomonas mobilis* o *Bradyrhizobium japonicum* (como se expone en el Ejemplo 3b de US 2012/0135477 A1).

Sin embargo, la enzima también puede producirse por  
5 medios recombinantes, usando técnicas que se conocen generalmente en la técnica.

El término "recombinante", como se usa con respecto a la producción de enzimas, se referirá con enzimas producidas mediante técnicas de ADN recombinantes, es decir, producidos  
10 de células transformadas por una construcción de ADN exógeno que codifica la enzima deseada. El término "ADN recombinante", por lo tanto, incluye un ADN recombinante incorporado en un vector en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionota o  
15 eucariota (o el genoma de una célula homóloga, en una posición distinta de la localización cromosómica natural).

La molécula(s) de ácido nucleico se enlaza operativamente a las secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células hospederas procarionotas y/o  
20 eucariotas. Como se usa en la presente, "enlazado operativamente" significa incorporado en una construcción genética, de modo que las secuencias de control de expresión controlan efectivamente la expresión de una secuencia codificante de interés. Los elementos reguladores de la  
25 transcripción/traslación mencionados anteriormente incluyen,

pero no se limitan a, promotores, potenciadores, operadores, silenciadores, represores inducibles y no inducibles, constitutivos, de ciclo celular regulado, metabólicamente regulados y otros elementos que son conocidos por los experimentados en la técnica y que conducen o de otra manera regulan la expresión génica. Tales elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a, elementos reguladores que dirigen la expresión constitutiva o que permiten la expresión inducible como, por ejemplo, promotor CUP-1, el represor tet como se emplea, por ejemplo, en los sistemas Tet-encendido o tet-apagado, el sistema lac, los elementos reguladores del sistema trp. A modo de ejemplo, isopropilo  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es un inductor efectivo de la expresión de proteínas en el intervalo de concentración de 100  $\mu$ M a 1.0 mM. Este compuesto es un mimético molecular de alolactosa, un metabolito de lactosa que desencadena la transcripción del operón *lac*, y por lo tanto, se usa para inducir la expresión de proteínas en el que el gen está bajo el control del operador *lac*.

Del mismo modo, molécula(s) de ácido nucleico puede formar parte de un gen híbrido que codifica las secuencias de polipéptidos adicionales, por ejemplo, una secuencia que funciona como un marcador o reportero. Ejemplos de genes marcadores e indicadores, incluyen beta-lactamasa, cloranfenicol acetil-transferasa (CAT), adenosin desaminasa

(ADA), aminoglucósido fosfotransferasa dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina cinasa (TK), lacZ (que codifica beta-galactosidasa), y xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Al igual  
5 que con muchos de los procedimientos estándares asociados a la práctica de la descripción, los experimentados serán conscientes de reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden tener la función de un marcador o reportero.

10 Los polinucleótidos recombinantes pueden codificar enzimas SHC, tales como SHC de tipo salvaje o una variante de la misma, que puede insertarse en un vector para la expresión y purificación opcional. Un tipo de vector es un plásmido que representa una espira de ADN de doble hebra circular, en la  
15 que se ligan los segmentos de ADN adicionales. Ciertos vectores pueden controlar la expresión de genes a los cuales están unidos funcionalmente. Estos vectores se denominan "vectores de expresión". Por lo general, los vectores de expresión adecuados para las técnicas de recombinación de ADN  
20 son del tipo de plásmido. Típicamente, un vector de expresión comprende un gen, tal como la SHC tipo salvaje o una variante de la misma. En la presente descripción, los términos "plásmido" y "vector" se usan indistintamente ya que el plásmido es el tipo de vector usado con mayor frecuencia.

25 Tales vectores pueden incluir secuencias de ADN que

incluyen, pero no se limitan a secuencias de ADN que no están presentes naturalmente en la célula hospedera, las secuencias de ADN que normalmente no se transcribe en ARN o traducción a una proteína ("expresado") y otros genes o secuencias de ADN que se desea introducir en el hospedero no recombinante. Se apreciará que típicamente el genoma de un hospedero recombinante se aumenta a través de la introducción estable de uno o más genes recombinantes. Sin embargo, los plásmidos o vectores autónomos o replicativos también se pueden usar dentro del alcance de esta descripción. Por otra parte, la presente descripción se puede practicar usando un bajo número de copias, por ejemplo, una única copia, o alto número de copias de plásmido o vector.

En una modalidad preferida, el vector de la presente descripción comprende plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras bacterianas y artificiales, construcciones "knock-out" o "knock-in" de gen inactivado y activado (modificadas genéticamente), secuencias de ácidos nucleicos sintéticos o casetes y subconjuntos pueden ser producidos en la forma de polinucleótidos lineales, plásmidos, megaplásmidos, cromosomas sintéticos o artificiales, tales como vegetales, cromosomas artificiales bacterianos, de mamífero o de levadura.

Se prefiere que las proteínas codificadas por el polinucleótido introducido se produzcan dentro de la célula

tras la introducción del vector. Los diversos sustratos de genes se pueden incorporar en plásmidos. Los plásmidos son a menudo vectores de clonación convencionales, por ejemplo, plásmidos multicopia bacterianos. Los sustratos pueden  
5 incorporarse en los mismos o diferentes plásmidos. A menudo, por lo menos dos tipos diferentes de plásmido que tiene diferentes tipos de marcadores seleccionables se usan para permitir la selección de células que contienen por lo menos dos tipos de vectores.

10       Típicamente las células bacterianas o de levadura pueden transformarse con cualquiera o más de las siguientes secuencias de nucleótidos, como es bien conocido en la técnica. Para la recombinación *in vivo*, el gen a ser recombinado con el genoma o de otros genes se usa para  
15 transformar el hospedero usando técnicas de transformación estándares. En una modalidad adecuada, el ADN que proporciona un origen de replicación se incluye en la construcción. El origen de replicación puede seleccionarse adecuadamente por el experimentado en la técnica. Dependiendo de la naturaleza  
20 de los genes, un origen adicional de replicación puede no ser necesario si las secuencias ya están presentes con los genes o del genoma que son operables como orígenes de replicación por sí mismos.

Una célula bacteriana o de levadura puede ser  
25 transformada por ADN exógeno o heterólogo cuando el ADN se ha

introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede o no puede estar integrado, es decir, unido covalentemente en el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episomal, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada establemente es una en la que el ADN transfectado se ha integrado en un cromosoma de manera que es heredado por las células hijas a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones formados por una población de células hijas que contienen el ADN transformante.

En general, el ADN introducido no es residente originalmente en el hospedero que es el destinatario del ADN, sino que está dentro del alcance de la descripción para aislar un segmento de ADN de un hospedero dado, y para introducir posteriormente una o más copias de ese ADN en el mismo hospedero, por ejemplo, para aumentar la producción del producto de un gen o alterar el patrón de expresión de un gen. En algunos casos, el ADN introducido se va a modificar o incluso sustituir a un gen endógeno o secuencia de ADN mediante, por ejemplo, la recombinación homóloga o mutagénesis dirigida al sitio. Los hospederos recombinantes adecuados incluyen microorganismos, células de plantas y plantas.

La presente descripción también ofrece hospederos recombinantes. El término "hospedero recombinante", también referido como una "célula hospedera genéticamente modificada" o una "célula transgénica", se refiere a una célula hospedera que comprende un ácido nucleico heterólogo o el genoma de las cuales ha sido aumentado por lo menos una secuencia de ADN incorporado. Una célula hospedera de la presente descripción puede manipularse genéticamente con el polinucleótido o el vector como se describió anteriormente.

Las células hospederas que pueden usarse para los propósitos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, células procariotas, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*), que pueden ser transformadas con, por ejemplo, ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido, cromosomas artificiales bacterianos, o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen las moléculas de polinucleótidos de la invención; células simples eucariotas, tales como levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*), que pueden ser transformadas con, por ejemplo, vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la molécula de polinucleótido de la descripción. Dependiendo de la célula hospedera y el vector respectivo usado para introducir el polinucleótido de la descripción, el polinucleótido se puede integrar, por ejemplo, en el cromosoma o el ADN mitocondrial o puede ser mantenido extracromosómicamente como, por

ejemplo, episomalmente o puede estar comprendido de manera transiente en las células.

El término "célula", como se usa en la presente, en particular con referencia a la ingeniería genética y la  
5 introducción de uno o más genes o un grupo de ensamblado de genes en una célula, o una célula de producción, se entiende que se refiere a cualquier célula procariota o eucariota. Las células hospederas procariotas y eucariotas se contemplan para su uso de acuerdo con la invención, que incluyen las  
10 células bacterianas huésped como *E. coli* o *Bacillus sp*, las células hospederas de levadura, tales como *S. cerevisiae*, células hospederas de insectos, tales como *Spodoptora frugiperda* o células hospederas humano, tales como HeLa y Jurkat.

15 Específicamente, la célula es una célula eucariota, de preferencia una célula fúngica, célula de mamífero o planta, o célula procariota. Las células eucarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células de mamífero, células de levadura, o células de insectos (incluyendo Sf9),  
20 células de anfibio (incluyendo células de melanóforos), o células de gusano, incluyendo células de *Caenorhabditis* (incluyendo *Caenorhabditis elegans*). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células COS (incluyendo Cos-1 y Cos-7), células CHO, células HEK293,  
25 células HEK293T, células HEK293 T-Rex<sup>TM</sup>, u otras líneas

celulares eucarióticas transfectables. Las células bacterianas adecuadas incluyen, sin limitación, *E. coli*.

De preferencia podrían usarse procariotas, tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, o células de mamífero, tales como células HeLa o células Jurkat, o células de plantas, como *Arabidopsis*.

De preferencia, la célula es de *Aspergillus sp* o una célula fúngica, de preferencia, se puede seleccionar del grupo que consiste de los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Aspergillus*.

De preferencia, la célula hospedera de *E. coli* es una célula hospedera de *E. coli* que es reconocida por las autoridades de la industria y de regulación (que incluye, pero no se limita a una célula hospedera de *E. coli* K12 o como se demuestra en los Ejemplos, una célula hospedera de *E. coli* BL21).

Una célula hospedera preferida para usar con la presente descripción es *E. coli*, que se puede preparar de manera recombinante como se describe en la presente. Por lo tanto, el hospedero recombinante puede ser una célula hospedera de *E. coli* recombinante. Hay bibliotecas de mutantes, plásmidos, modelos detallados por computadora del metabolismo y otra información disponible para *E. coli*, lo que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el rendimiento del

producto. Los métodos similares a los descritos anteriormente para *Saccharomyces* pueden usarse para hacer los microorganismos recombinantes de *E. coli*.

En una modalidad, el microorganismo recombinante de *E. coli* comprende secuencias de nucleótidos que codifican genes SHC o equivalentes funcionales/homologías de los mismos incluyendo, pero no se limitan a las variantes, homólogos mutantes, derivados o fragmentos de los mismos.

Otra célula hospedera preferida para usar con la presente descripción es *S. cerevisiae*, que es un organismo chasis usado ampliamente en biología sintética. Por lo tanto, el hospedero recombinante puede ser *S. cerevisiae*. Hay bibliotecas de mutantes, plásmidos, modelos detallados por computadora del metabolismo y otra información disponible para *S. cerevisiae*, lo que permite el diseño racional de los distintos módulos para mejorar el rendimiento del producto. Se conocen métodos para la fabricación recombinante de microorganismos de *S. cerevisiae*.

El cultivo de las células se lleva a cabo, de una manera convencional. El medio de cultivo contiene una fuente de carbono, por lo menos una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas, y las vitaminas se adicionan a la misma. Los constituyentes de este medio pueden ser los que se usan convencionalmente para el cultivo de la especie de microorganismo en cuestión.

Las fuentes de carbono de uso en el presente método incluyen cualquier molécula que puede ser metabolizada por la célula hospedera recombinante para facilitar el crecimiento y/o la producción de (-)-Ambrox. Ejemplos de las fuentes de carbono adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sucrosa (por ejemplo, como se encuentra en la melaza), fructosa, xilosa, glicerol, glucosa, celulosa, almidón, celobiosa u otro polímero que contiene glucosa.

En modalidades que emplean levadura como huésped, por ejemplo, son apropiadas las fuentes de carbono, tales como sucrosa, fructosa, xilosa, etanol, glicerol y glucosa. La fuente de carbono puede ser proporcionada para el organismo huésped durante todo el periodo de cultivo o, alternativamente, el organismo puede cultivarse durante un periodo de tiempo en presencia de otra fuente de energía, por ejemplo, proteína, y luego proporcionarse de una fuente de carbono sólo durante la fase de alimentación discontinua.

La conveniencia de un microorganismo de la célula hospedera recombinante para uso en los métodos de la presente descripción puede ser determinada por los procedimientos de prueba simples usando los métodos bien conocidos. Por ejemplo, el microorganismo a probar se puede propagar en un medio rico (por ejemplo, medio LB, medio de extracto de levadura Bacto-triptona, medio nutritivo y similares) a un pH, temperatura y bajo condiciones de aireación usadas

comúnmente para la propagación del microorganismo. Una vez que se seleccionan los microorganismos recombinantes (es decir, células hospedero recombinantes) que producen los productos deseados de bioconversión, los productos se producen típicamente por una línea celular huésped de producción a gran escala por los sistemas y las fermentaciones de expresión adecuados, por ejemplo mediante producción microbiana en cultivo celular.

En una modalidad de la presente descripción, un medio mínimo definido como M9A se usa para el cultivo celular. Los componentes del medio M9A comprenden: 14 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L de citrato de  $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7.5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.25 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.015 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 g/L de glucosa y 1.25 g/L de extracto de levadura).

En otra modalidad de la presente descripción, se usó un medio rico en nutrientes, tal como LB (Luria-Bertani). Los componentes de LB comprenden: 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de  $\text{NaCl}$ .

Otros ejemplos de Medio Mineral y Medio Mineral M9 se describen, por ejemplo, en US 6,524,831 B2 y US 2003/0092143 A1.

El microorganismo recombinante puede ser cultivado en un lote, alimentado por lotes o proceso continuo o combinaciones de los mismos. Típicamente, el microorganismo recombinante se cultiva en un fermentador a una temperatura definida en

presencia de una fuente de nutrientes adecuado, por ejemplo, una fuente de carbono, por un periodo de tiempo deseado para bioconvertir el homofarnesol a (-)-Ambrox en una cantidad deseada.

5 Las células hospedero recombinantes pueden cultivarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por lote de cultivo o el cultivo de alimentación por lotes. Como se usa en la presente, el término "cultivo por lotes" es un método de cultivo en el que ni se adiciona medio de cultivo ni se  
10 retira durante el cultivo. Como se usa en la presente, el término "alimentación por lotes" significa un método de cultivo, en el que se adiciona un medio de cultivo durante el cultivo, pero no se retira el medio de cultivo.

Una modalidad de la presente descripción proporciona un  
15 método de producción de (-)-Ambrox en un sistema celular que comprende la producción de SHC de tipo salvaje o variantes del mismo bajo condiciones adecuadas en un sistema celular, la alimentación de homofarnesol al sistema celular, la conversión de la homofarnesol a (-)-Ambrox usando la SHC o  
20 variantes producidas mediante el sistema celular, colectando (-)-Ambrox del sistema celular y el aislamiento del (-)-Ambrox del sistema. La expresión de otras secuencias de nucleótidos puede servir para mejorar el método. El método de bioconversión puede incluir la expresión adicional de otras  
25 secuencias de nucleótidos en el sistema celular. La expresión

de otras secuencias de nucleótidos puede mejorar la ruta de bioconversión para la elaboración de (-)-Ambrox.

Una modalidad adicional de la presente descripción es un método de bioconversión para la elaboración de (-)-Ambrox, que comprende crecer células hospederas que comprenden SHC de tipo salvaje o genes variantes, la producción de enzimas SHC o variante de tipo salvaje en las células hospederas, la alimentación de homofarnesol (por ejemplo EEH) a las células hospederas, la incubación de las células hospederas bajo condiciones de pH, temperatura y agente de solubilización adecuado para promover la conversión de homofarnesol a Ambrox y colectar (-)-Ambrox. La producción de la SHC de tipo salvaje o enzimas variantes en las células hospederas proporciona un método de fabricación de (-)-Ambrox cuando se adiciona homofarnesol a las células hospederas en condiciones de reacción adecuadas. La conversión lograda puede ser mejorada mediante la adición de más biocatalizador y SDS a la mezcla de reacción.

El microorganismo de la célula hospedera recombinante puede ser cultivado en un número de maneras para proporcionar células en cantidades adecuadas que expresan los tipos SHC o enzimas salvajes variantes para la etapa de bioconversión subsecuente. Dado que los microorganismos aplicables para la etapa de bioconversión varían ampliamente (por ejemplo, levaduras, bacterias y hongos), las condiciones de cultivo

son, por supuesto, ajustadas a los requisitos específicos de cada especie y estas condiciones son bien conocidas y documentadas. Cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para el crecimiento de microorganismos de células  
5 hospedero recombinantes puede usarse para producir las células utilizables en la etapa de bioconversión subsecuente de la presente descripción. Típicamente, las células se cultivan a una densidad particular (medible como la densidad óptica (DO)) para producir una biomasa suficiente para la  
10 reacción de bioconversión. Las condiciones de cultivo elegidas influyen no sólo en la cantidad de células obtenidas (la biomasa), sino la calidad de las condiciones de cultivo también influye en la forma en que la biomasa se convierte en un biocatalizador. El microorganismo de la célula hospedera  
15 recombinante que expresa la SHC de tipo salvaje o genes variantes y la producción de la SHC de tipo salvaje o enzimas variantes se denomina un biocatalizador que es adecuado para el uso en una reacción de bioconversión. En algunas modalidades, el biocatalizador es una célula completa  
20 recombinante que produce SHC de tipo salvaje o enzimas variantes o puede estar en suspensión o un formato inmovilizado.

En una modalidad, el biocatalizador se produce en cantidades suficientes (para crear una biomasa suficiente),  
25 cosecharse y lavarse (y opcionalmente almacenarse (por

ejemplo, congelarse o liofilizarse)) antes de la etapa de bioconversión.

En una modalidad adicional, las células se producen en cantidades suficientes (para crear un biocatalizador suficiente) y las condiciones de reacción después se ajustan sin la necesidad de cosechar y lavar el biocatalizador para la reacción de bioconversión. Este método de una etapa (o "un recipiente") es ventajoso, ya que simplifica el proceso y reduce los costos. El medio de cultivo usado para cultivar las células también es adecuado para uso en la reacción de bioconversión, siempre que las condiciones de reacción se ajusten para facilitar la reacción de bioconversión.

Los métodos de bioconversión de la presente descripción se llevan a cabo bajo condiciones de tiempo, temperatura, pH y agente solubilizante para proporcionar la conversión de la materia prima homofarnesol a (-)-Ambrox. El pH de la mezcla de reacción puede estar en el intervalo de 4-8, de preferencia, 5 a 6.5, más preferentemente 4.8-6.0 para las enzimas variantes de SHC y en el intervalo de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0 para la enzima SHC de tipo salvaje y puede ser mantenido por la adición de amortiguadores a la mezcla de reacción. Un amortiguador ejemplar para este propósito es un amortiguador de ácido cítrico. Alternativamente, el agua de la llave o agua desionizada suplementados con o sin NaCl al 0.5% ó 0.9% se

pueden usar como un sustituto de amortiguador cuando se ajusta a un pH, que proporciona actividad de biocatalizador óptima, incluyendo pero no se limita al intervalo de pH de 5.0 a 8.0.

5        Por consiguiente, la invención proporciona, en otro aspecto, una forma sólida de (-)-Ambrox formada u obtenida por un proceso de bioconversión descrito en la presente, en el que la reacción de bioconversión se lleva a cabo en un medio de uso de agua de la llave o agua desionizada como un  
10        amortiguador sustituto y en el intervalo de pH que asegura la actividad biocatalítica óptima, de preferencia un intervalo de pH 5.0-8.0.

      La temperatura preferida es entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 45°C, de preferencia aproximadamente 20°C y  
15        aproximadamente 40°C, aunque puede ser mayor, hasta 55°C para organismos termófilos, especialmente si se usa la enzima de tipo salvaje de un microorganismo termófilo. La temperatura puede mantenerse constante o puede ser alterada durante el proceso de bioconversión.

20        Puede ser útil incluir un agente solubilizador (por ejemplo, un surfactante, detergente, mejorador de la solubilidad, solvente orgánico miscible en agua y similares) en la reacción de bioconversión. Ejemplos de surfactantes incluyen, pero no se limitan a Triton X-100, Tween 80,  
25        taurodesoxicolato, taurodesoxicolato de sodio, dodecilsulfato

de sodio (SDS) y/o lauril sulfato de sodio (SLS).

El solicitante ha seleccionado e identificado SDS como un agente solubilizante particularmente útil de una larga lista de otros agentes solubilizantes menos útiles. En particular, el solicitante identificó SDS como un agente de solubilización considerablemente mejor que, por ejemplo, Triton X-100 en términos de velocidad de reacción y el rendimiento para la reacción de bioconversión de homofarnesol a (-)-Ambrox.

Sin desear estar ligado por la teoría, el uso de SDS con células hospederas microbianas recombinantes puede ser ventajoso, ya que el SDS podría interactuar ventajosamente con la membrana de la célula hospedera para hacer a la enzima SHC (que es una enzima unida a la membrana) más accesible al sustrato homofarnesol. Además, la inclusión de SDS a un nivel adecuado en la mezcla de reacción puede mejorar las propiedades de la emulsión (homofarnesol en agua) y/o mejorar el acceso del sustrato homofarnesol a la enzima SHC dentro de la célula hospedera, mientras que al mismo tiempo, la prevención de la interrupción (por ejemplo, desnaturalización/inactivación de la SHC de tipo salvaje o enzima variante).

La concentración del agente de solubilización (por ejemplo, SDS) usado en la reacción de bioconversión es influenciada por la cantidad de biomasa y la concentración de

sustrato (EEH). Es decir, hay un grado de interdependencia entre la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS), la cantidad de biomasa y la concentración de sustrato (EEH). A manera de ejemplo, ya que la concentración del sustrato homofarnesol aumenta, las cantidades suficientes de biocatalizador y el agente solubilizante (por ejemplo SDS) se requieren para que se lleve a cabo una reacción de bioconversión eficiente. Si, por ejemplo, la concentración del agente de solubilización (por ejemplo, SDS) es demasiado baja, se puede observar una conversión de homofarnesol sub-  
10 óptima. Por otro lado, si, por ejemplo, la concentración del agente de solubilización (por ejemplo, SDS) es demasiado alta, entonces puede haber un riesgo de que el biocatalizador sea afectado a través de la interrupción de la célula  
15 microbiana intacta y/o una desnaturalización/inactivación de la enzima SHC/HAC.

La selección de una concentración adecuada de SDS en el contexto de la cantidad de biomasa y la concentración de sustrato (EEH) está dentro del conocimiento de la persona  
20 experimentada. A modo de ejemplo, un modelo de predicción está disponible para el experimentado en la técnica para determinar las concentraciones adecuadas de SDS, sustrato (EEH) y biomasa.

La temperatura de la reacción de bioconversión para una  
25 enzima de SHC de tipo salvaje es de aproximadamente 45-60°C,

de preferencia 55°C.

El intervalo de pH de la reacción de bioconversión para una enzima de SHC tipo salvaje es de aproximadamente 5.0 a 7.0, más preferentemente de aproximadamente 5.6 a aproximadamente 6.2, incluso más preferentemente de aproximadamente 6.0.

La temperatura de la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC es de aproximadamente 34°C a aproximadamente 50°C, de preferencia de aproximadamente 35°C.

El pH de la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC es de aproximadamente 4.8-6.4, de preferencia de aproximadamente 5.2-6.0.

De preferencia, el agente de solubilización usado en la reacción de bioconversión es SDS.

La relación de [SDS]/[células] está en el intervalo de aproximadamente 10:1-20:1, de preferencia de aproximadamente 15:1-18:1, de preferencia de aproximadamente 16:1, cuando la relación de biocatalizador a EEH homofarnesol es de aproximadamente 2:1.

La concentración de SDS en la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC está en el intervalo de aproximadamente 1-2%, de preferencia el intervalo de aproximadamente 1.4 a 1.7%, incluso más preferentemente de aproximadamente 1.5%, cuando la concentración de homofarnesol es de aproximadamente 125 g/L EEH y la concentración de

biocatalizador es de 250 g/L (correspondiente a una OD de aproximadamente 175 (650 nm)).

La relación de biocatalizador para el sustrato de EEH homofarnesol está en el intervalo de aproximadamente 0.5:1-  
5 2:1, en algunas modalidades 2:1, de preferencia de aproximadamente 1:1 ó 0.5:1.

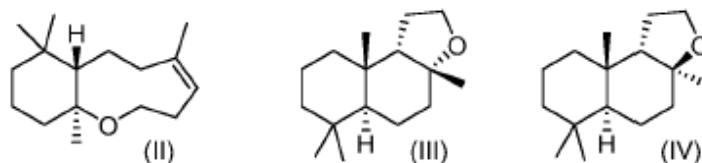
En algunas modalidades, (-)-Ambrox se produce usando un biocatalizador al que se adiciona el sustrato de homofarnesol. Es posible agregar el sustrato por la  
10 alimentación usando medios conocidos (por ejemplo, bomba peristáltica, una jeringa de infusión y similares). El homofarnesol es un compuesto soluble en aceite y se proporciona en un formato de aceite. Dado que el biocatalizador está presente en una fase acuosa, la reacción  
15 de bioconversión puede ser considerada como un sistema de dos fases cuando se adiciona homofarnesol a la mezcla de reacción de bioconversión. Este es el caso incluso cuando está presente un agente de solubilización (por ejemplo, SDS).

Otros detalles de las condiciones de proceso de  
20 bioconversión adecuadas se describen en los ejemplos, expuestos en la presente a continuación.

El proceso de bioconversión produce un medio de bioconversión que contiene el (-)-Ambrox deseado, y también un número de subproductos. Más particularmente, el medio  
25 además contiene, (-)-Ambrox una mezcla compleja de

subproductos, incluyendo un nuevo isómero constitucional de (-)-Ambrox de acuerdo con la fórmula (II), así como los estereoisómeros conocidos de (-)-Ambrox de acuerdo con las fórmulas (III) y (IV):

5



El solicitante cree, aunque no tiene intención de estar ligado por ninguna teoría en particular, que el compuesto de la fórmula (II) está formado por la ciclación del isómero geométrico 7E,3Z de homofarnesol. Se ha descrito como prácticamente inodoro, con un umbral de detección de >500 ng/L.

Como se indicó anteriormente, el solicitante cree que el compuesto de la fórmula (II) es una nueva molécula, y como tal, este compuesto forma un aspecto adicional de la presente invención.

Los ingredientes de perfume y las composiciones de perfume que consisten de o que comprenden el compuesto (II), así como los artículos perfumados que contienen los mismos, forman aspectos adicionales de la invención.

El uso del compuesto de la fórmula (II) como un ingrediente de perfume en las aplicaciones de perfumería, tales como perfumes finos o composiciones de perfume funcionales, tales como cuidado personal, cuidado del hogar y

el cuidado de tejidos, forma aspectos adicionales de la invención.

Las mezclas de (-)-Ambrox y una cantidad aceptable olfatoria del compuesto (II) forma todavía otro aspecto de la presente invención.

El término "cantidad olfativa aceptable", como se usa en la presente, con relación al compuesto de la fórmula (II), o cualquiera de los otros subproductos (III) o (IV), o de hecho, cualquier material que podría estar presente como impureza en (-)-Ambrox formado de acuerdo con un método de la presente invención, se entiende que significa que el compuesto o material está presente en una mezcla con (-)-Ambrox en una cantidad por debajo de su umbral de detección de olor, o en una cantidad a la que no contribuirá con sus características olfativas de una manera que afecte el carácter olfativo de (-)-Ambrox. (-)-Ambrox que contiene una cantidad olfativa aceptable de cualquiera de tales compuestos o material, sería identificable a un perfumista experimentado como que posee el carácter de olor de calidades comerciales de (-)-Ambrox, tales como AMBROFIX™ obtenido por un procedimiento sintético ex-esclareol y disponible en Givaudan.

En modalidades preferidas de la presente invención, la mezcla de reacción no contiene ninguna, o sustancialmente ningún, homofarnesol sin reaccionar.

El solicitante descubrió que el homofarnesol fue un solvente efectivo para (-)-Ambrox, así como para los subproductos mencionados del proceso de bioconversión. Como tal, en presencia de cantidades apreciables de homofarnesol, (-)-Ambrox y los subproductos permanecen disueltos juntos en una mezcla cruda, intratable, de la que es difícil, prolongado y costoso separar y finalmente aislar el (-)-Ambrox en la forma olfativamente pura. Reducir el nivel de homofarnesol sin reaccionar en mezcla con (-)-Ambrox y los compuestos (II), (III) y (IV) se encontró que facilita considerablemente el procesamiento corriente abajo y el aislamiento/purificación de (-)-Ambrox.

El procesamiento corriente abajo, como se apreciará por los experimentados en la técnica, es una operación crítica en la manufactura de compuestos útiles formados por procesos de bioconversión. Como parte de la síntesis de un compuesto, puede afectar las propiedades físicas del compuesto. En el caso de la preparación de ingredientes de perfume por los métodos de biotecnología, es deseable que un compuesto blanco se pueda separar de una mezcla de reacción en forma olfativamente pura para que las características de olor deseadas del compuesto de destino no sean distorsionadas por las contribuciones de olor de la mezcla compleja de contaminantes y subproductos que pueden estar presentes en el medio de fermentación o el biocatalizador.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de aislamiento y purificación de (-)-Ambrox desde un medio de bioconversión, que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV).

5 En aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para mejorar o exacerbar el olor de (-)-Ambrox, que comprende las etapas de separación y purificación de (-)-Ambrox de un medio de bioconversión que contiene uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV).

10 En una forma aislada y purificada, (-)-Ambrox o bien no contiene cualquiera de los compuestos (II), (III) o (IV), o si no contiene ninguno de estos compuestos, entonces cada uno debe estar presente en una cantidad olfatoria aceptable.

El medio de bioconversión obtenido del proceso de  
15 bioconversión descrito anteriormente en la presente, comprende generalmente una fase sólida que contiene un (-)-Ambrox crudo y una fase o fases que consisten de agua líquida y una fase aceitosa que puede contener cualquier homofarnesol residual y cualesquiera otras impurezas o subproductos  
20 aceitosos o solubles en aceite. Uno o más de los subproductos (II), (III) y (IV) puede estar presente en tal fase aceitosa.

La fase sólida se puede separar de la fase líquida o fases por filtración, tal como filtración centrífuga o decantación. Además, y con respecto a la separación por  
25 filtración, mediante la selección de un filtro con un tamaño

de malla apropiado, también es posible separar la forma sólida de (-)-Ambrox, del material particulado en el medio de bioconversión, por ejemplo material celular y/o residuos. La decantación, similar a la filtración, aprovecha la diferencia  
5 de tamaño de partícula entre esta materia particulada y la forma sólida de (-)-Ambrox para permitir su separación, el restante anterior suspendido en un sobrenadante, que puede ser desechado, mientras que el último puede aislarse como un sedimento, para ser recuperado y, opcionalmente, sometido a  
10 etapas de purificación adicionales.

Una vez que el (-)-Ambrox se separa del material particulado, por ejemplo material celular y/o los residuos, así como la fase líquida o fases líquidas, puede ser lavado, antes de ser sometido a otros procedimientos de preparación  
15 para aislar (-)-Ambrox de cualquier impureza restante, tales como los compuestos (II), (III) y (IV).

En una modalidad particular de la presente invención, este método de aislamiento y purificación de (-)-Ambrox comprende la etapa de cristalizar selectivamente (-)-Ambrox  
20 partir de una mezcla que puede contener uno o más de los compuestos (II), (III) o (IV), así como cualesquiera otras impurezas formadas en el medio de bioconversión.

La frase "cristalizar selectivamente" se refiere a una etapa de proceso por la que el (-)-Ambrox se hace cristalizar  
25 a partir de un solvente, mientras que los subproductos, tales

como los compuestos (II), (III) y (IV), o cualquier otra impureza permanecen disueltos en el solvente de cristalización, en una medida tal que el material cristalino aislado contiene solamente (-)-Ambrox, o si contiene  
5 cualquiera de los subproductos, tales como los compuestos (II), (III) o (IV), o cualesquiera otras impurezas, entonces están presentes sólo en cantidades olfativas aceptables.

La cristalización selectiva se puede presentar cuando (-)-Ambrox cristaliza del medio de bioconversión, mientras que  
10 cualquiera de las impurezas, tales como subproductos (II), (III) o (IV) que pueden estar presentes en el medio de bioconversión, se mantienen en una fase aceitosa. En tal caso, cualquiera de los compuestos (II), (III) y (IV) presente en el medio de bioconversión se puede separar del (-)  
15 )-Ambrox cristalino por decantación y/o filtración y lavarse durante las mismas etapas de proceso, ya que el (-)-Ambrox está siendo separado de cualquier material particulado, tales como células y residuos celulares.

(-)-Ambrox cristalizada del medio de bioconversión, se  
20 puede separar por filtración y/o decantación de la manera descrita anteriormente. Después de esto, los cristales pueden ser disueltos en un solvente adecuado, y la solución procesarse adicionalmente, también de la manera descrita anteriormente. En particular, la solución puede ser micro-  
25 filtrada para eliminar cualquier material particulado

residual, tales como células o residuos celulares; decolorarse haciéndola pasar sobre un agente de blanqueo adecuado; y/o cristalizarse selectivamente a partir del solvente para separar el (-)-Ambrox cristalino de los  
5 residuos de subproductos, tales como los compuestos (II), (III) o (IV), o cualesquiera otras impurezas residuales.

La cristalización puede llevarse a cabo en un solvente orgánico adecuado. La elección del solvente se basa en consideraciones, tales como diferencias de solubilidad a  
10 temperatura ambiente y a altas temperaturas, o en solvente a ebullición; y por la necesidad de una gran cantidad de cristales a recuperar en solvente fresco. Por lo general, un compuesto a separar se disuelve en un solvente relativamente polar y luego un solvente relativamente menos polar puede  
15 adicionarse para llevar el compuesto disuelto a su límite de solubilidad, después de lo cual comenzará a cristalizar. Además, en un proceso industrial, los problemas de costo, así como la seguridad de la manipulación son relevantes. Los solventes adecuados incluyen, pero no se limitan a metanol,  
20 acetona, éter de petróleo, hexano, t-butil metil éter, THF y acetato de etilo. Los solventes preferidos incluyen alcohol etílico. También se pueden emplear pares de solventes.

En una modalidad particularmente preferida de la presente invención, la cristalización selectiva se lleva a  
25 cabo mediante la disolución de la mezcla que contiene (-)-

Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV) en etanol caliente y permitiendo que (-)-Ambrox cristalice selectivamente por adición lenta de un no solvente, tal como agua, a la solución etanólica enfriada.

5 Considerando la estrecha relación estructural de (-)-Ambrox y los compuestos de los subproductos (II), (III) y (IV), que son respectivamente un isómero constitucional y dos estereoisómeros de (-)-Ambrox, era notable que (-)-Ambrox pudo cristalizar selectivamente a partir de una mezcla de  
10 este tipo, para proporcionar (-)-Ambrox en forma olfativamente pura y con altos rendimientos. El experimentado anticiparía razonablemente que uno o más de los compuestos cristalizaría bajo las mismas condiciones o sustancialmente similares, ya que (-)-Ambrox que hace el procesamiento  
15 corriente abajo mucho más complejo, consumidor de tiempo y costoso, se encontró que resultó ser el caso.

La manera sorprendentemente fácil en la que (-)-Ambrox podría separarse de una mezcla que contiene el compuesto (II), (III) y/o (IV) por cristalización representa una  
20 ventaja particular de la presente invención.

La facilidad con que (-)-Ambrox podría separarse por cristalización podría ser contrastado con la observación de que (-)-Ambrox no se pudo recuperar de manera fácil y en tal alto rendimiento a partir de una mezcla que contiene (II),  
25 (III) y/o (IV) por otras técnicas de purificación, tales como

por rectificación, debido a los puntos de ebullición muy similares de (-)-Ambrox y los subproductos (II), (III) y (IV), o por extracción de solvente.

El término "olfativamente puro", como se usa con  
5 relación a (-)-Ambrox, se entiende que significa que (-)-Ambrox es libre de compuestos (II), (III) o (IV), o cualquier otro material encontrado en la mezcla de reacción, o que si tales compuestos o materiales deben estar presentes, están presentes en cantidades olfativas aceptables, como se define  
10 tal término en la presente.

En una modalidad de la invención (-)-Ambrox en forma olfativamente pura contiene menos de 5% en peso de cualquiera de los compuestos (II), (III) o (IV).

En modalidades más particulares, (-)-Ambrox en forma  
15 olfativamente pura contiene menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, menos de 1%, menos de 0.9%, menos de 0.8%, menos de 0.7%, menos de 0.6%, menos de 0.5%, menos de 0.4%, menos de 0.3%, menos de 0.2%, menos de 0.1%, o menos de 0.05% en peso de cada uno de los compuestos (II), (III) o (IV).

20 La calidad de la separación de (-)-Ambrox de la mezcla de los compuestos (II), (III) y/o (IV) por cristalización selectiva puede estar influenciada por la composición de la mezcla de la que se separa. Más particularmente, la calidad de la separación de (-)-Ambrox de una mezcla de compuestos  
25 (II), (III) y/o (IV) por cristalización se mejoró cuando la

relación en peso de (-)-Ambrox a los otros compuestos (II), (III) y (IV) en la mezcla fue mayor que 70:30, más particularmente 80:20, más particularmente 90:10, todavía más particularmente 95:5, y aún más particularmente 97:3.

5        Además, la calidad de la separación de (-)-Ambrox por cristalización puede verse influida por la cantidad de homofarnesol sin reaccionar presente en la mezcla de la que se separa. Más particularmente, se mejora la calidad de la separación cuando el nivel de homofarnesol sin reaccionar es  
10    menor que 30% en peso, más particularmente menor que 20% en peso, más particularmente menor que 10% en peso, todavía más particularmente menor que 5% en peso y todavía más particularmente menor que 3% en peso, todavía más particularmente menor que 2% en peso, y aún más  
15    particularmente menor que 1% en peso, basado en el peso de la mezcla de la que (-)-Ambrox se cristaliza.

De preferencia, los reactivos y condiciones de reacción empleados en el proceso de bioconversión de la presente invención son tales que la reacción procede con 100% de  
20    conversión de homofarnesol, o sustancialmente así, no dejando, de esta manera, homofarnesol sin reaccionar en el medio de bioconversión. Sin embargo, si está presente el homofarnesol sin reaccionar, aunque económicamente desventajoso, se puede separar a partir de (-)-Ambrox y otros  
25    subproductos por destilación, o los lavarse los cristales de

(-)-Ambrox con un solvente adecuado, por ejemplo.

Por consiguiente, en una modalidad particular de la invención, se proporciona un método de aislamiento y purificación de (-)-Ambrox de una mezcla que comprende uno o  
5 más de los compuestos (II), (III) y (IV), cuya mezcla está libre, o sustancialmente libre, de homofarnesol.

En una modalidad más particular, el aislamiento y purificación de (-)-Ambrox de una mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), y libre o  
10 sustancialmente libre de homofarnesol, se consigue mediante la cristalización selectiva de (-)-Ambrox.

(-)-Ambrox obtenido de acuerdo con un método de la presente invención se obtiene en la forma olfativamente pura.  
(-)-Ambrox olfativamente puro forma otro aspecto de la  
15 presente invención.

(-)-Ambrox en la forma cristalina forma aún otro aspecto de la presente invención.

(-)-Ambrox formado de acuerdo con el método de la presente invención se puede mezclar con uno o más  
20 ingredientes de perfume para formar composiciones de perfume que encuentran uso en aplicaciones de perfumería, incluyendo el uso en perfumería fina, así como su uso en productos de consumo, tales como cuidado personal, cuidado de las telas y aplicaciones para el cuidado del hogar.

25 Por consiguiente, la invención proporciona, en otro de

sus aspectos, una composición de perfume que comprende (-)- Ambrox y por lo menos otro ingrediente de perfume, en donde la composición de perfume contiene cantidades olfativas aceptables de uno o más de los compuestos (II), (III) o (IV).

5

## EJEMPLOS

Ejemplo 1:

### Preparación de homofarnesol

Condiciones generales de análisis:

GC/MS no polar: 50°C/2 minutos, 20°C/min 200°C, 35°C/min  
 10 270°C. GC/MS Agilent MSD 5975C con el sistema de GC HP 7890A Series. Columna no polar: BPX5 de SGE, 5% de fenilo 95% de dimetilpolisiloxano 0.22 mm x 0.25 mm x 12 m. Gas portador: helio. Temperatura del inyector: 230°C. División 1:50. Flujo: 1.0 mL/min. Línea de transferencia: 250°C. MS-cuadrupolo:  
 15 106°C. MS-fuente: 230°C.

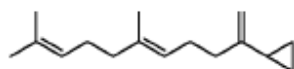
### A) Preparación de MNU en THF

Una solución de urea (175 g, 2.9 mol) y clorhidrato de metilamina (198 g, 2.9 mol) en agua (400 ml) se calienta a reflujo (105°C) durante 3.5 h con agitación. A 40°C, se  
 20 adiciona  $\text{NaNO}_2$  (101 g, 1.45 mol) disuelto en agua (200 ml). Después de 15 minutos, se adiciona THF (1,000 ml) que resulta en una mezcla de 2 fases transparente. Se adiciona  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (110 g, 1.1 mol) a 0-5°C y agitando dentro de 1.5 h. Después de otra 0.5 h a 0-5°C, las dos fases transparentes  
 25 se separan a 25°C. La fase orgánica (A) (1065 ml,

teóricamente 1.35 M) se almacena durante unos pocos días a 0-5°C o se reenvía inmediatamente al reactor de ciclopropanación.

Después de la separación de fases, la fase acuosa se extrae dos veces con THF (2 x 1 L). Esto da 1,100 mL de la fase B y 1,075 de la fase C. Considerando que la fase A da una conversión de 51% de un alqueno terminal a un ciclopropano en una reacción de ciclopropanación subsecuente, la fase B proporciona <0.5% de ciclopropano y la fase C no proporciona ninguna conversión detectable. Se concluye que >99% de MNU se extrae después de la primera separación de fases. Por lo general, por lo tanto, la fase acuosa se desecha después de la primera separación de fases (de fase orgánica A) después del tratamiento con KOH acuoso concentrado y ácido acético.

#### B) Preparación de E- $\Delta$ -farneseno usando MNU en THF



Se adiciona N-metil-N-nitroso urea 1.35 M en THF (136 mL, 184 mmol) gota a gota a 0°C a una mezcla agitada rápidamente de E-beta-farneseno (CAS 18794-84-8) (25 g, 122 mmol) y KOH acuoso (50 ml, 40%) a 0-5°C. Después de la adición de 4 mL de la solución de MNU, se adiciona Pd(acac)<sub>2</sub> (7.4 mg, 0.024 mmol, 0.02%) pre-disuelto en 0.5 ml de diclorometano. La solución de MNU restante se adiciona

durante 4 h a 0-5°C. Una GC en esta etapa mostró 28% de E-beta-farneseno no convertido, 65% del monociclopropano deseado (mostrado anteriormente) y 3% de un compuesto bisciclopropanado 5. Después de 16 h a 25°C, se adiciona  
5 ácido acético (100 mL) a 0-5°C, a continuación, terc-butil metil éter (250 ml). Después de la separación de fases, la fase orgánica se lava con HCl 2 M (250 mL) y la fase acuosa se extrae con terc-butil metil éter (250 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 100 mL), NaOH  
10 acuoso al 10% (2 x 100 mL) y agua (2 x 100 ml), se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra para dar 26.9 g de un líquido ligeramente amarillo que contiene 9% de E-beta-farneseno, 82% del compuesto monociclopropano deseado y 6% de un producto secundario bisciclopropanado.

15 El compuesto deseado se puede aislar aún más por purificación por destilación.

La adición de 1 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 g) y la destilación en una columna de bobina de acero de 30 cm a 40-60 mbar proporciona  
147 g de del compuesto monociclopropano (68% corr) a 135-  
20 145°C. Las fracciones se agruparon para dar 92 g del compuesto monociclopropano de 100% de pureza.

Los datos analíticos de E-Δ-farneseno:

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 5.1 (2 m, 2 H), 4.6 (2 H), 2.2 (2 H), 2.1 (4 H), 2.0 (2 H), 1.7 (s, 3 H), 1.6 (2 s, 6 H),  
25 1.3 (1 H), 0.6 (2 H), 0.45 (2 H) ppm. RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400

MHz): 150.9 (s), 135.1 (s), 131.2 (s), 124.4 (d), 124.1 (d),  
 106.0 (t), 39.7 (t), 35.9 (t), 26.7 (t), 25.7 (q), 17.7 (q),  
 16.0 (d), 6.0 (t) ppm. GC/MS: 218 (2%, M+), 203 (5%, [M-  
 15+]), 175 (11%), 147 (31%), 134 (15%), 133 (20%), 121 (12%),  
 5 107 (55%), 95 (16%), 93 (30%), 91 (20%), 82 (11%), 81 (33%),  
 79 (42%), 69 (100%), 67 (22%), 55 (20%), 53 (21%), 41 (75%).  
 IR (película): 3081 (w), 2967 (m), 2915 (m), 2854 (m), 1642  
 (m), 1439 (m), 1377 (m), 1107 (w), 1047 (w), 1018 (m), 875  
 (s), 819 (m), 629 (w). Análisis calculado para C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>: C,  
 10 88.00; H, 12.00. Encontrado: C, 87.80; H, 12.01.

C) Preparación de (7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-  
 ol ((7E)-homofarnesol)

Una mezcla de (E)-(6,10-dimetilundeca-1,5,9-trien-2-  
 il)ciclopropano (E-Δ farneseno) (1 g, 4.6 mmol), dodecano  
 15 (0.2 g, 1.15 mmol, estándar interno) y ácido L-(+)-tartárico  
 (1 g, 6.9 mmol) en un tubo de presión se calienta bajo  
 agitación a 150°C. Después de 18 h y la conversión completa  
 (de acuerdo con GC), la mezcla se vierte en agua (50 mL) y  
 tolueno (50 mL). Las fases se separaron y la fase acuosa se  
 20 extrae con tolueno (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se  
 lavan con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso concentrado (50 mL) y NaCl concentrado  
 (2 x 50 ml), se secan sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtran y se evaporan a  
 presión reducida para dar una resina de color café (1.35 g)  
 que se mezcla con KOH acuoso al 30% (4.3 ml) y se agita a  
 25 25°C durante 2 h. El análisis de GC revela la formación de

96% de (7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-ol de acuerdo con el estándar interno. Relación E/Z 68:22. Los datos analíticos del isómero E son consistentes con los de la literatura, ver, por ejemplo, P. Kocienski, S. Wadman J. Org. Chem. 54, 1215 (1989).

### Ejemplo 2

Preparación del plásmido SHC y producción de biocatalizador

#### Preparación del plásmido de SHC

El gen que codifica escualeno hopeno ciclasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) (GenBank M73834, Swissprot P33247) se insertó en el plásmido pET-28a(+), en donde está bajo el control de un promotor T7 inducible IPTG para la producción de proteína en *Escherichia coli*. El plásmido se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) usando un protocolo estándar de transformación de choque térmico.

#### Cultivos en matraz Erlenmeyer

Para la producción de proteínas se usaron ya sea medio rico (medio LB) o medio mínimo. M9 es un ejemplo del medio mínimo, que se usaron con éxito.

#### Preparación del medio

El medio mínimo elegido como predeterminado se preparó como sigue para el cultivo de 350 mL: a 35 mL de ácido cítrico/reserva de fosfato (133 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 40 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 17 g/g de ácido cítrico  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  con pH ajustado a 6.3) se adicionaron 307 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , el pH se ajustó a 6.8 con

NaOH al 32% conforme se requirió. Después del tratamiento en autoclave de 0.850 mL de  $\text{MgSO}_4$  al 50%, se adicionaron 0.035 mL de solución de elementos traza (composición en la siguiente sección), 0.035 mL de solución de tiamina y 7 mL de glucosa al 20%.

#### Producción de biocatalizador de SHC (producción de biocatalizador)

La producción de biocatalizador a pequeña escala (de SHC de tipo salvaje o variantes de SHC), 350 mL de cultivo (medio suplementado con 50  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina) se inocularon a partir de un pre-cultivo de la cepa BL21 de *E. coli* (DE3) que contiene el plásmido de producción SHC. Las células se cultivaron a una densidad óptica de aproximadamente 0.5 ( $\text{OD}_{650 \text{ nm}}$ ) a 37°C con agitación constante (250 rpm).

La producción de la proteína después se indujo por la adición de IPTG a una concentración de 300  $\mu\text{M}$  seguido de incubación durante otras 5-6 horas con agitación constante. La biomasa resultante se colectó finalmente por centrifugación, se lavó con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Las células se almacenaron en forma de pelotillas a 4°C o -20°C hasta su uso posterior. En general, 2.5 a 4 gramos de células (peso húmedo) se obtuvieron de 1 litro de cultivo, independientemente del medio usado.

La fermentación se preparó y se corrió en 750 mL de reactores InforsHT. Al recipiente de fermentación se adicionó

168 mL de agua desionizada. El recipiente de reacción estaba equipado con todas las sondas requeridas ( $pO_2$ , pH, muestreo, antiespumantes), C+N de alimentación y botellas de hidróxido de sodio y se trató en autoclave. Después de la autoclave,

5 los siguientes ingredientes se adicionan al reactor:

20 mL de amortiguador de fosfato/ácido cítrico 10x

14 mL de glucosa al 50%

0.53 mL de solución de  $MgSO_4$

2 mL de solución de  $(NH_4)_2SO_4$

10 0.020 de solución de elementos traza

0.400 mL de solución de tiamina

0.200 mL de solución madre de canamicina

Las condiciones de reacción se establecen como sigue:

pH=6.95,  $pO_2$  = 40%, T = 30°C, agitación a 300 rpm. Cascada:

15 punto de ajuste de rpm a 300, mínimo 300, máximo 1000, punto

de ajuste de flujo de L/minuto 0.1, mínimo 0, máximo 0.6.

Control de Antiespuma: 1:9.

El fermentador se inoculó de un cultivo de siembra a un

OD<sub>650</sub> nm de 0.4-0.5. Este cultivo de siembra se cultivó en

20 medio LB (+ canamicina) a 37°C, 220 rpm durante 8 h. La

fermentación se llevó a cabo primero en el modo por lotes

durante 11.5 h, en donde después de que se inició la

alimentación de C+N con una solución de alimentación

(solución de glucosa esterilizada (143 mL de  $H_2O$  + 35 g de

25 glucosa) a la que se había adicionado después de la

esterilización: 17.5 mL de solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.8 mL de solución de  $\text{MgSO}_4$ , 0.018 mL de solución de elementos traza, 0.360 mL de solución de tiamina, patrón de 0.180 mL de canamicina. La alimentación se realizó a una velocidad de  
5 flujo constante de aproximadamente 4.2 mL/h. Las mediciones de glucosa y  $\text{NH}_4^+$  se realizaron externamente para evaluar la disponibilidad de las fuentes de C- y N- en el cultivo. Por lo general, los niveles de glucosa se mantienen muy bajos.

Los cultivos se crecieron durante un total de  
10 aproximadamente 25 horas, en donde alcanzaron típicamente un  $\text{OD}_{650}$  nm de 40-45. La producción de SHC se inició adicionando IPTG a una concentración final de aproximadamente 1 mM en el fermentador (como pulso de IPTG o durante un periodo de 3-4 horas usando una jeringa de infusión), ajustando la  
15 temperatura a 40°C y  $\text{pO}_2$  a 20%. La inducción de la producción de SHC duró 16 h a 40°C. Al final de la inducción se colectaron las células por centrifugación, se lavaron con amortiguador de ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M, pH 5.4 y se almacenaron en forma de pelletillas a 4°C ó -20°C hasta  
20 su uso posterior.

### **Resultados Ia**

En general, con todas las otras condiciones sin cambios, la actividad específica del biocatalizador producido fue superior cuando se usó un medio mínimo en comparación con un  
25 medio rico.

La inducción se llevó a cabo con éxito en 30 ó 37°C. Se observó que cuando la inducción se realizó a 40-43°C, se obtuvo un biocatalizador de mayor actividad específica.

### **Resultados Ib**

La siguiente Tabla 1 muestra para dos ejemplos del volumen de cultivo, la densidad óptica y cantidad de células tanto en el inicio de la inducción y la inducción final, así como la cantidad de biomasa colectada (peso húmedo).

**Tabla 1**

|           | Volumen<br>inducción<br>de inicio<br>(mL) | OD <sub>650</sub><br>inducción<br>de inicio | células<br>calculadas<br>(g) | Volumen<br>inducción<br>final<br>(mL) | OD <sub>650</sub><br>inducción<br>final | células<br>colectadas<br>(g) |
|-----------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| Ejemplo 1 | 273                                       | 40                                          | 10.9                         | 342                                   | 55                                      | 28                           |
| Ejemplo 2 | 272                                       | 44                                          | 12.0                         | 341                                   | 57                                      | 23                           |

OD<sub>650nm</sub> a la inoculación: 0.45 (Ejemplo 1) y 0.40 (Ejemplo 2).  
Volúmenes de partida: 205 mL.

### **Secuencia de aminoácido de SHC de tipo salvaje (SEC ID No. 1) (GenBank M73834, Swissprot P33247)**

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDVRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALY  
 PGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVMPVPPEIMFLGKRMPLN  
 IYEFGSWARATWALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIR  
 ALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHFAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAA  
 GLPADHDLRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAWVWALNTRLRLPDERRRRDAMTKGFR  
 WIVGMQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGGSWF  
 GRWGVNLYLGTGAWSALKAVGIDTREPYIQKALDWEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGG  
 RAESEAAARRGVQYLVEQTQRPDGGWDEPYTGTGTFPGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

**Secuencia de aminoácido de F601Y SHC variante (SEC ID NO. 2)**  
**- variante con respecto a la SEC ID No. 1**

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALY  
 PGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMVPPEIMFLGKRMPLN  
 IYEFGSWARATWALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIR  
 5 ALDWLLERQAGDGSWGGIQQPWFYALIALKILDMTQHFAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAA  
 GLPADHDLRVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAWVWALNLTLLRPDERRRRDAMTKGFR  
 WIVGMQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWF  
 GRWGVNLYLTGAWSAKAVGIDTREPIYQKALDWEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGG  
 RAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGYPGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

**Secuencia de nucleótidos F605W SHC variante (SEC ID NO. 3)**

10 ATGGCTGAGCAGTTGGTGGGAAGCGCCGGCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCTCCTGCCAAAAG  
 GACGAAGGCTACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGTCCTCTTGTGCCACATTCTCGAT  
 CGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCACGAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGTAC  
 CCGGGTGGGCCGCCGACCTCGACACGACCATCGAGGCGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTGCGCGCAGCAGAGGAG  
 CCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTCATTAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTCGCGGTGTTACGCGGATGTGGCTGGCG  
 CTGGTGGGAGAATATCCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAAC  
 ATCTACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCGCTG  
 15 CCCGAGCGGGCGCGCTGCCCAGCTGTACGAGACCGACGTGCCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCCAAGGGAGGGGGTGGGTGG  
 ATCTTCGACGCGCTCGACCGGGCGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTGGTGCACCCGTTCCGCCGCGCGGCCGAGATCCGC  
 GCCTTGGAAGTGGTGTGTCGAGCGCCAGGCCGAGACGGCAGCTGGGGCGGGATTACAGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATC  
 GCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCATCCGGCGTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTG  
 GATTACGGAGGATGGATGTTTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCG  
 GGGCTTCCGGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGGTTCCGGGCGACTGG  
 20 GCGGTGAAGCGCCCAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACTGTACTACCCGACGTGGACGACACG  
 GCCGTGCTGGTGTGGGCGCTCAACACCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGCGGGACGCCATGACGAAGGGATTCCGC  
 TGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGCGGTTGGGGCGCTACGACGTCGACAAACACGAGCGATCTCCGAACCACATC  
 CCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGCCGTAGAGGACGTACCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTC  
 GGGTACGATGACGCCTGGAAGGTATCCGGCGCGGGTGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTC  
 GGTGCTTGGGGCGTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTGGGATCGACACGCGCGAG  
 CCGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTGCCGCTCGTAC  
 25 GAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGACCCCGTCGACAGCGGCTGGGGCGCTGATGGCGCTCATCGCGGGCGGC

AGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGCGCTGCAATACCTCGTGGAGACGCAGCGCCCGGACGGCGGGCTGGGATGAGCCG  
TACTACACCGGCACGGGCTTCCCAGGGGATTGGTACCTCGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTC  
GGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGCAGGTGA

**Secuencia de aminoácidos F605W SHC variante (SEC ID No. 4) -  
variante con respecto a la SEC ID No. 1**

5 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDVRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALY  
PGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPVPEIMFLGKRMPLN  
IYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIR  
ALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHFAFIKWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAA  
GLPADHDLRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFR  
WIVGMQSSNGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGGSWF  
10 GRWGVNLYLGTGAVVSALKAVGIDTREPIYQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGG  
RAESEAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPGDWYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

**Ejemplo 3a**

Bioconversión de mezcla de 7E, 3E/Z-homofarnesol

La bioconversión se llevó a cabo usando las siguientes  
condiciones de reacción:

La reacción (150.1 g de volumen total) corrida en  
amortiguador de ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M, pH 5.4  
en un fermentador InforsHT de 750 mL contuvo 146 g/L de  
homofarnesol total usando un sustrato de homofarnesol, que  
fue una mezcla de 7E,3E:7E,3Z de 86:14, de 250 g/L de células  
(formadas de acuerdo con el método del Ejemplo 2,  
fermentación) y 1.55% de SDS. La reacción se corrió a 35°C  
con agitación constante (900 rpm), el control de pH se  
realizó usando ácido cítrico al 10 a 40% en agua.

La mezcla de reacción se sometió a aislamiento y

purificación como se expone en el Ejemplo 4, a continuación.

### **Ejemplo 3b**

La bioconversión de la mezcla de 7E, 3E/Z-homofarnesol

La bioconversión se llevó a cabo usando las siguientes  
5 condiciones de reacción:

Una reacción (volumen total 2.5 mL) se llevó a cabo con  
agitación vigorosa (800 rpm) a 50°C y pH 6.0 en amortiguador  
de ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M en un recipiente de  
reacción de vidrio de 11 mL en un aparato Heidolph Synthesis  
10 1. La reacción contuvo 1 g/L, E,E-homofarnesol (de una  
reserva de Homofarnesol de relación EE:EZ de 86:14), las  
células que habían producido la enzima SHC de tipo salvaje de  
acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2 a una OD<sub>650nm</sub> de  
30 y 0.12% de SDS. Aproximadamente 48 h después del inicio de  
15 reacción, la conversión de E,E-homofarnesol fue de  
aproximadamente 60%.

Cuando la reacción se enfrió a temperatura ambiente, los  
cristales de Ambrofix aparecieron en el análisis microscópico  
de una muestra tomada de la mezcla de reacción. Una adición  
20 adicional de células equivalente a un aumento en OD<sub>650nm</sub> por 10  
y una incubación adicional durante 24 horas permitió la  
conversión completa de E,E-homofarnesol. La observación  
microscópica de una muestra de la mezcla de reacción indicó  
la presencia de un mayor número de cristales de Ambrofix.

25 La reacción también se llevó a cabo en un fermentador de

750 mL InforsHT en 150.1 g de volumen total a pH 6.0 en amortiguador de ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M. La reacción contuvo 1 g/l de E,E-Homofarnesol, 0.12% de SDS y las células habían producido SHC de tipo salvaje a 118 g/L de peso húmedo y se incubaron a 50°C con agitación vigorosa (700 rpm). Aproximadamente 30 horas después del inicio de la reacción, la conversión de E,E-homofarnesol fue de aproximadamente 85%. La observación microscópica de una muestra de la mezcla de reacción permitió la identificación de cristales de Ambrofix. El homofarnesol se adicionó de nuevo a un equivalente de 1 g/L y la reacción se corrió durante aproximadamente 50 horas adicionales; las células se adicionaron también al equivalente de 32 g/L (peso húmedo). Aproximadamente 66 horas de tiempo de reacción total, la conversión de E,E-homofarnesol fue de aproximadamente 85%. La observación microscópica de la mezcla de reacción permitió la observación de un aumento en el número de cristales de Ambrox.

#### **Ejemplo 4**

El proceso de corriente descendente general se establece en la Figura 4, a continuación, por referencia.

En una primera etapa, el medio de bioconversión se calienta a una temperatura de aproximadamente 80 a 85°C durante un periodo de aproximadamente 15 minutos, la fusión de los cristales de (-)-Ambrox. El (-)-Ambrox, que es líquido

en esta etapa, se recrystaliza por enfriamiento del medio de reacción a una temperatura de 20°C a una velocidad de aproximadamente 5°C por hora.

En una segunda etapa, después de que (-)-Ambrox ha  
5 cristalizado, los cristales se separan del medio de  
bioconversión por filtración. La filtración se lleva a cabo  
en una centrífuga de tamiz continuo (Siebtechnik H250) con un  
tamaño de tamiz de 100 micrómetros. La centrífuga se opera a  
una aceleración de 2028 G, y una velocidad de alimentación de  
10 430 kg/hora. Debido a la diferencia de tamaño significativa  
entre los cristales y residuos de células, la mayoría de los  
cristales son retenidos en el tamiz, y se pueden lavar con  
agua y colectarse mecánicamente por medio de un cuchillo  
provisto para tal propósito.

15 En una tercera etapa, el filtrado de la segunda etapa se  
alimenta a un decantador continuo configurado para separar  
los residuos celulares, retenidos en el sobrenadante, de  
cualquier cristal que pasó a través del filtro en la etapa 2,  
que se sedimentan en el aparato de decantador como un  
20 sedimento. El decantador se opera a 1170 G y una velocidad de  
alimentación de 370 kg/hora. Los cristales colectados en el  
decantador se lavan con agua, y se combinan con los cristales  
obtenidos en la etapa 2. Los cristales combinados se lavan y  
se decantan estáticamente para eliminar los residuos de  
25 células residuales en el sobrenadante, y los cristales

lavados están listos para el procesamiento adicional.

En una cuarta etapa, los cristales lavados se vuelven a solubilizar con etanol (grado técnico al 96%) en una cantidad de 1 masa de cristales a 4 masa de etanol. La solución se  
5 filtra sobre un filtro sub-micrométrico (0.6 a 1.0 micrómetros, KDS15) a temperatura ambiente y 1 bar de presión, antes de filtrarse de nuevo a través de un filtro de 0.22 micrómetros.

El extracto de (-)-Ambrofix así formado puede ser  
10 sometido a otras etapas de desodorización y decoloración, como sigue.

La solución etanólica se concentró a sequedad al vacío. El concentrado se volvió a disolver en etanol desnaturalizado de grado industrial y se adicionaron, bajo agitación, un  
15 agente de blanqueo (Tonsil 412FF) además de un agente de filtración de tierra de diatomáceas (CELATOM FW 50). La mezcla se sometió a reflujo a 80-85°C bajo agitación durante 30 minutos, antes de enfriar a 55-60°C. La mezcla se filtró sobre un filtro de 25 micrómetros para eliminar los  
20 materiales sólidos.

El alcohol desnaturalizado en exceso se elimina de la solución blanqueada clarificada por destilación a presión atmosférica. Después se alimenta agua a la solución caliente y la mezcla resultante se agita durante 15 minutos a 75-80°C.  
25 El (-)-Ambrox se cristalizó por enfriamiento gradual de esta

solución hasta -10 a -15°C. El (-)-Ambrox cristalizado se separó por filtración y se secó en un horno al vacío (50-60°C; 1-5 mbar).

### **Ejemplo 5a**

5 Procesamiento corriente abajo: Comparación de la separación sólido-líquido y la extracción de tolueno como un medio para aislar selectivamente (-)-Ambrox del medio de bioconversión

Se extrajeron 200 mL del medio de bioconversión inactivado con MTBE y se analizaron por cromatografía de gases.

#### Separación sólido-líquido

Se centrifugaron 200 mL de medio de bioconversión inactivado para separar el sólido de la fase líquida (Sorvall GS3, 5000 rpm, 10 min, 10°C). Esto separó aproximadamente 80 ml de pelotillas de sólido de aproximadamente un sobrenadante líquido de 120 mL. El sobrenadante se retiró, se extrajo con MTBE y se analizó por cromatografía de gases. Del mismo modo, la pelotilla se extrajo con MTBE y el extracto de MTBE se analizó por cromatografía de gases.

20 Extracción con tolueno

Se extrajeron 200 mL de medio de bioconversión con 45 mL de tolueno 6x. Se colectó la fase orgánica y se filtró para eliminar los residuos de células. El tolueno arrastró, y el residuo se disolvió en MTBE, antes de ser analizados por cromatografía de gases.

### Análisis

Los resultados del análisis de GC se representan en la Figura 3, a continuación. De los resultados es evidente que la fase sólida colectada por centrifugación contuvo niveles muy altos de (-)-Ambrox, y cantidades muy bajas de los subproductos II, III y IV. Por otra parte, el extracto de tolueno no se enriqueció en (-)-Ambrox en comparación con el medio de bioconversión crudo. Los resultados indican que mientras que (-)-Ambrox cristaliza a partir del medio de bioconversión; los compuestos estructuralmente relacionados (II), (III) y (IV) permanecen en la fase líquida. Los residuos de (II), (III) y (IV) que se encontraron en el análisis de la fase sólida fueron simplemente residuos que podrían removerse con un lavado a fondo de la fase sólida.

### **Ejemplo 5b**

Análisis sensorial

Propósito: Llevar a cabo un análisis sensorial de (-)-Ambrox y los compuestos (II), (III) y (IV) formado en el material en bruto y en el material cristalizado.

La biotransformación de E,E-homofarnesol, resulta en (-)-Ambrox y el compuesto (IV).

La biotransformación de E,Z-homofarnesol resulta en el compuesto de éter macrocíclico (II) y el compuesto epi-Ambrox (III).

Una mezcla en bruto de (-)-Ambrox comprende el (-)-Ambrox deseado, el compuesto (II), (III) y (IV) presente en

una cantidad de 87.1% en peso, 2.8% en peso, 2.5% en peso y 7.6% en peso respectivamente.

Cuando una mezcla en bruto se cristaliza selectivamente (escala de laboratorio), el material cristalizado, cuando se  
5 analiza por cromatografía de gases, tiene los mismos componentes que la mezcla en bruto, pero están presentes en una cantidad de 99.1% en peso, 0.1% en peso, 0.1% en peso y 0.7% en peso respectivamente. Los residuos de (II), (III) y (IV) se cree que son residuos aceitosos unidos a los  
10 cristales de (-)-Ambrox.

Los resultados analíticos sensoriales fueron como sigue:

(-)-Ambrox: Umbral de olor 0.2 ng/L.

Compuesto (IV): débil, IsoE, a madera, umbral de detección de GC 5-10 ng.

15 Compuesto (II): "inodoro" (umbral GC >500 ng).

Compuesto (III): Umbral GC aproximadamente 10x mayor que (-)-Ambrox (circa 2 ng).

El análisis sensorial de los 3 subproductos (compuestos II, III y IV) indica un olor más débil que el de (-)-Ambrox.  
20 De hecho, el olor de epi-Ambrox (Compuesto III) es aproximadamente 10 veces más débil que (-)-Ambrox que sugiere que es esencialmente inodoro.

El análisis sensorial demostró que la remoción de uno o más compuestos de subproductos de (-)-Ambrox puede mejorar el  
25 olor del compuesto restante (es decir () Ambrox), incluso si

los compuestos removidos son en realidad compuestos inodoros *per se*. Esto es, se observó un mejoramiento de olor de Ambrox en términos de pureza olfativa, como se determina por los perfumistas entrenados (usando puntos de referencia reconocidos por la pureza olfativa aceptable) en ausencia de los compuestos II, III y IV.

### **Ejemplo 6**

Caracterización de rayos X de la forma sólida de (-) Ambrox formada por el proceso de fermentación microbiana

Los patrones de difracción de rayos X en polvo se adquirieron usando un difractómetro de rayos X STOE STADI P.

Descripción del sistema: El difractómetro se usó en modo de transmisión (soportes de muestra plana, monocromador curvado de Germanio (111), y radiación CuK $\alpha$ 1 1.54060 Angstrom) usando un detector sensible a la posición. El voltaje del generador fue de 40 kV y la corriente de 40 mA. El detector: Mythen IK.

Parámetros experimentales: La medición del patrón se hizo entre 2 theta = aproximadamente 4° a 26°. La precisión de los ángulos de difracción determinados es de aproximadamente +/- 0.2° 2 theta.