



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 183**

(51) Int. Cl.:
C12P 17/14 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07712350 .3**
(96) Fecha de presentación : **28.02.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1994162**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de 2-oxazolidinonas sustituidas en 5 ópticamente activas a partir de epóxidos racémicos y cianato empleando una halohidrina deshalogenasa.**

(30) Prioridad: **03.03.2006 EP 06110638**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2009

(73) Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

(72) Inventor/es: **Hauer, Bernhard;**
Majeric Elenkov, Maja y
Janssen, Dirk Barend

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de 2-oxazolidinonas sustituidas en 5 ópticamente activas a partir de epóxidos racémicos y cianato empleando una halohidrina deshalogenasa.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de oxazolidinonas ópticamente enriquecidas.

Antecedentes de la invención

Nakamura *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991, Vol 180, No.1, 124-130) describen una nueva función catalítica de halohidrina haluro de hidrógeno liasa para la síntesis de β -hidroxinitrilos.

Spelberg *et al.* (Tetrahedron Asymmetry 2002, 13, 1083-1089) analizan el potencial biocatalítico de halohidrina deshalogenasa procedente de *Agrobacterium radiobacter*.

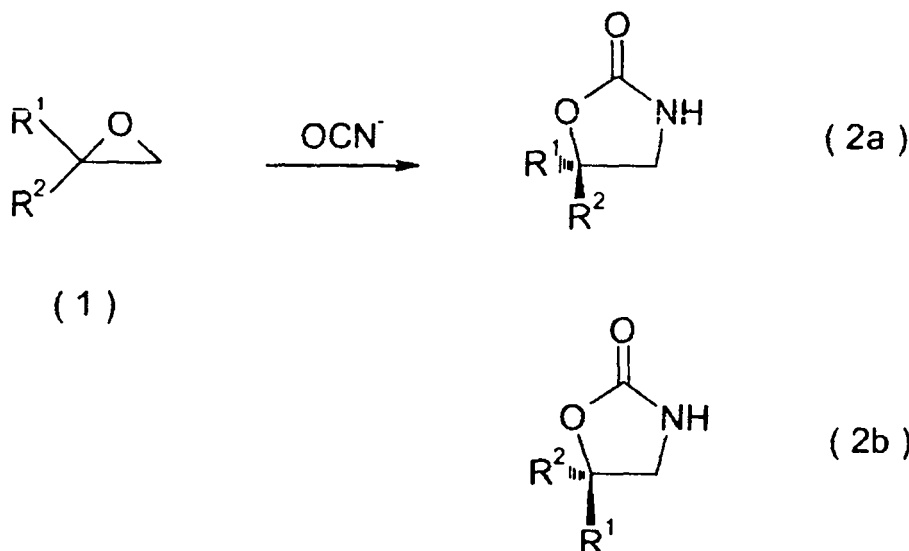
WO 2005/017141 divulga halohidrina deshalogenasas mejoradas y polinucleótidos relacionados.

US 2003/0124693A1 divulga la conversión enzimática de epóxidos.

WO 01/90397 divulga la conversión enzimática de epóxidos con diferentes nucleófilos hasta los alcoholes correspondientes.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de oxazolidinonas ópticamente enriquecidas de la fórmula (2a) o (2b), haciendo reaccionar un epóxido de la fórmula (1) con un cianato en presencia de halohidrina deshalogenasa.



en el que R1 y R2 se eligen independientemente entre sí de hidrógeno y grupos alquilo, grupos arilo, grupos aralquilo, grupos alquenoilo y grupos cicloalquilo opcionalmente sustituidos, con la condición R1 $\neq$ R2, y recuperar la oxazolidinona ópticamente enriquecida.

La enzima usada es una halohidrina deshalogenasa. Una halohidrina deshalogenasa muy adecuada es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el Listado de Secuencias (N° ID SEC: 1) o uno de sus homólogos o derivados funcionales. En el contexto de la invención, el término “un homólogo” se refiere a una secuencia que es al menos 90% homóloga, y preferiblemente al menos 90% idéntica, a la secuencia de la que es un homólogo. Un derivado funcional es un polipéptido que ha sufrido una pequeña derivación o modificación sustancialmente sin afectar adversamente a las propiedades enzimáticas y catalíticas del polipéptido: Ejemplos adecuados de enzimas que pueden usarse son halohidrina deshalogenasa de *Agrobacterium radiobacter* (CBS 750.97), *Mycobacterium sp.* cepa GP1 (Poelarends *et al.* J. Bacteriol., 1999, 181, 2050) o *Arthrobacter sp.* cepa AD2 (van den Wijngaard *et al.*, J. Bacteriol., 1991, 124).

Se han obtenido buenos resultados particulares usando una halohidrina deshalogenasa derivada de *Agrobacterium radiobacter* cepa AD1 (HheC) depositada en la Centraal Bureau voor de Schimmelcultures el 7 de mayo de 1997 bajo el número de depósito CBS 750.97. Otra enzima obtenida de este organismo se ha descrito extensamente en la solicitud internacional de patente WO 98/53081 con respecto a su actividad de epóxido hidrolasa.

Debe apuntarse que una enzima usada de acuerdo con la invención, una halohidrina deshalogenasa, debe distinguirse de las epóxido hidrolasas. Las últimas se han descrito extensamente en Archer, Tetrahedron, 53 (1997), pp. 15617-15662. La única característica que pueden tener en común ambos tipos de enzimas es que pueden aislarse de *Agrobacterium radiobacter* cepa AD1. Asimismo, Lutje Spelberg *et al.*; Tetrahedron: Asymmetry, 9 (1998), pp. 459-466 y la solicitud de patente europea EP 0 879 890 se refieren a aplicaciones de una epóxido hidrolasa.

La actividad bajo las condiciones de procesamiento, la estabilidad y la enantioselectividad de la halohidrina deshalogenasa pueden mejorarse mediante métodos conocidos en la especialidad, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio para retirar grupos lábiles y para modificar la enantioselectividad, evolución dirigida empleando barajado génico ("gene shuffling"), mutagénesis por saturación del sitio, o mutagénesis aleatoria inspirada en la estructura, o PCR tendente al error. Estos métodos se conocen en la especialidad (Powell *et al.*, 2001, ACIE 40, 3948; Otten y Quax, 2005, Biomol. Eng. 22, 1; Williams *et al.*, 2004, Cell Mol Life Sci. 61:3034). Tales métodos de mutagénesis son aplicables para mejorar el comportamiento de halohidrina deshalogenasa según se observaba recientemente mediante la construcción de mutantes con actividad y enantioselectividad incrementadas (Tang *et al.*, 2005, Biochemistry 44, 6609; Tang *et al.*, 2003, Biochemistry 42, 14057) y de mutantes con estabilidad mejorada (Tang *et al.*, 2002, Enz Microb Techn. 30, 251).

Halohidrina deshalogenasas mejoradas se divulgan, por ejemplo, en WO 2005/018579 A2 y WO 2005/017141 A1. Las mutaciones que se introducían incluyen reemplazos de Cys por Ser. Halohidrina deshalogenasas mejoradas adicionales pueden producirse introduciendo mutaciones en la posición 134 (Thr) del N° ID SEC:1, especialmente sustituciones tales como el reemplazo de Thr por Ala.

La enzima puede añadirse como células enteras, en forma liofilizada como un extracto en bruto o como una enzima purificada. La enzima puede inmovilizarse sobre portadores macroscópicos tales como celulosa, Sephadex o dextrano. La enzima también puede aplicarse como cristales enzimáticos reticulados (CLEC's, por sus siglas en inglés) o atrapada en micelas invertidas. En un experimento típico, una solución de enzima se mezcla con una solución tamponadora que contiene un nucleófilo y un epóxido. Opcionalmente, pueden añadirse a la mezcla de reacción aditivos tales como mercaptoetanol o glicerol para estabilizar la enzima.

El epóxido de la fórmula (1) puede prepararse a partir de la cetona correspondiente usando iluros de sulfonio (Mosset, P.; Gree, R. Syn. Comm. 1985, 15, 749-757) o mediante oxidación de alquenos usando un ácido peroxycarboxílico tal como m-CPBA (ácido meta-cloroperoxibenzoico) (Schwartz, N. N.; Blumbergs, J. H. J. Org. Chem. 1964, 29, 1976-1979).

Los grupos R1 y R2 son independientemente entre sí hidrógeno, grupos aromáticos o alifáticos opcionalmente sustituidos, que contienen preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, R1 y R2 se eligen del grupo de hidrógeno y grupos alquilo, arilo, aralquilo, alquenoilo, cicloalquilo y alcoxi opcionalmente sustituidos. Puede producirse una oxazolidinona terciaria ópticamente enriquecida de la fórmula (2a) o (2b) mediante el procedimiento de acuerdo con la invención sólo si R1 es químicamente distinto de R2.

Ejemplos preferidos del grupo alquilo representado por R1 o R2 incluyen grupos alquilo lineales o ramificados que tienen de 1 a 15 átomos de carbono tales como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo pentilo, un grupo hexilo, un grupo heptilo o un grupo dodecilo.

Residuos preferidos adicionales son aquellos en los que R1 y R2 se eligen del grupo H, $-(CH_2)_n-CH_3$, con $n = 0$ a $n = 8$, $-C_6H_5$ (fenilo), $-(CH_2)_n-(C_6H)_5$ (arilalquilo), $-C_6H_{11}$ (ciclohexilo), $CH_2CO_2R_3$, y R3 se elige de $-CH_3$ (metilo), $-C_2H_5$ (etilo), $-C(CH_3)_3$ (terc-butilo).

El grupo alquilo puede tener sustituyentes tales como un átomo de halógeno. El grupo alquilo puede tener un sustituyente tal como un grupo hidroxilo, por ejemplo glicidol. El grupo alquilo puede tener un grupo amino no sustituido o sustituido tal como amino, metilamino o dimetilamino. Ejemplos de grupos arilo representados por R1 o R2 incluyen grupos fenilo y naftilo. Derivados de óxido de estireno que tienen un sustituyente o múltiples sustituyentes en el anillo aromático son ejemplos del grupo fenilo. Ejemplos representativos de epóxidos son óxido de estireno, óxido de 4-nitroestireno, óxido de 2-nitroestireno, óxido de 3-nitroestireno, óxido de 3-cloroestireno, óxido de 4-cloroestireno u óxido de 2,3-dicloroestireno. Ejemplos de grupos aralquilo representados por R1 o R2 incluyen un grupo bencilo, un grupo 2-feniletilo y un grupo 1-naftilmetilo. Ejemplos de grupos alquenoilo representados por R1 o R2 incluyen un grupo vinilo, un grupo alilo y un grupo 5-hexenilo. Ejemplos de grupos cicloalquilo representados por R1 o R2 incluyen un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo y un grupo ciclohexilo. Ejemplos de grupos alcoxi representados por R1 o R2 incluyen un grupo fenoxi, un grupo 4-nitrofenoxi, un grupo naftiloxi, un grupo metoxi, un grupo hexiloxi y un grupo viniloxi.

El epóxido (1) puede estar presente en forma solubilizada en una concentración de 1 a 300 mM o como una segunda fase sólida o líquida en una concentración de hasta 300 mM en el medio de reacción. El propio epóxido puede ser la

segunda fase o puede estar disuelto en una segunda fase orgánica. Esto puede realizarse disolviendo el epóxido en un disolvente orgánico que es inmiscible con agua, tal como hexano u octano. La solución obtenida se pone en contacto a continuación con la fase acuosa que contiene la enzima y las dos fases se mezclan vigorosamente. El uso de tal segunda fase tiene la ventaja de que puede simplificarse la separación del epóxido y el alcohol después de la reacción.

Generalmente, se espera que el alcohol permanezca solubilizado en la fase acuosa y el epóxido pueda recuperarse típicamente de la fase orgánica. Preferiblemente, el epóxido se pone antes de su conversión en un medio acuoso en el que preferiblemente estará presente en una cantidad de 0,01 a 20% en peso, basado en los pesos combinados del medio acuoso y el epóxido.

Se prefiere llevar a cabo la reacción en un medio acuoso tamponado en el que el epóxido (1) está solubilizado o se añade como una segunda fase sólida o líquida. Tampones adecuados son, por ejemplo, tampón de Tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol ajustado hasta un pH deseado con H_2SO_4), tampón de glicina (glicina ajustada hasta un pH deseado mediante NaOH), tampón de fosfato o tampón de MOPS (ácido 4-morfolinopropanosulfónico ajustado hasta un pH deseado con NaOH). Estos se usan preferiblemente en una concentración de 50 a 250 mM.

Opcionalmente, pueden añadirse codisolventes como dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano o acetonitrilo para incrementar la solubilidad del epóxido (1). Los codisolventes pueden añadirse en cantidades de 5% en volumen hasta 50% en volumen. Un porcentaje creciente de codisolvente puede favorecer la solubilidad del epóxido (1). Sin embargo, puede observarse una desactivación poco ventajosa de la enzima a concentraciones de codisolvente superiores.

El pH del medio está preferiblemente entre 3 y 12, más preferiblemente entre 6,5 y 8. La temperatura a la que se lleva a cabo la reacción está preferiblemente entre 0 y 60°C, más preferiblemente entre 20 y 30°C.

El cianato que reacciona en el procedimiento de acuerdo con la invención se añade preferiblemente como un cianato alcalino tal como cianato sódico o potásico.

Después de la reacción, toda la mezcla de reacción puede extraerse usando disolventes orgánicos tales como éter dietílico, acetato de etilo, diclorometano o tolueno. El enantiómero del epóxido que no reacciona o lo hace sólo muy lentamente y la oxazolidinona ópticamente enriquecida de la fórmula (2a) o (2b) pueden separarse subsiguientemente mediante técnicas tales como cristalización (en el caso de las sustancias sólidas), destilación fraccionada o cromatografía de desarrollo rápido, por ejemplo sobre sílice 60H usando heptano/acetato de etilo (relación 7:3) como eluyente u otras técnicas de separación bien conocidas en la materia.

La composición enantiomérica de los epóxidos y las oxazolidinonas (2a) o (2b) puede determinarse usando cromatografía de gases quiral o HPLC quiral.

Los epóxidos ópticamente enriquecidos separados pueden usarse para etapas sintéticas adicionales, especialmente para una apertura de anillo con agentes nucleófilos que permite la producción de un alcohol terciario sustituido en una forma ópticamente pura.

Ejemplos

Ejemplo I

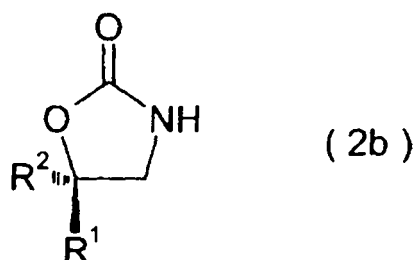
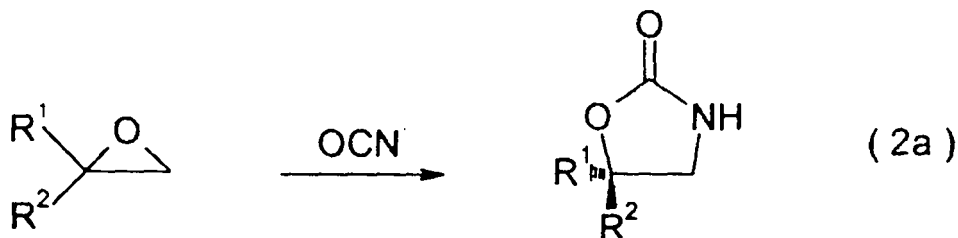
250 mmol de 2-etiloxirano racémico (fórmula 1, $R_1 = H$; $R_2 = Et$) se disolvieron en tampón de Tris- SO_4 500 mMol (pH 7,5), seguido por la adición de enzima purificada (1% en peso de halohidrina deshalogenasa HheC en tampón de Tris) y NaOCN 125 mmol. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (24°C) y se verificó mediante cromatografía de gases (GC). La reacción se detuvo después de 24 h y se extrajo tres veces añadiendo acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron. El producto en bruto se cromatografió sobre gel de sílice 60 H usando pentano/ CH_2Cl_2 (4:6) como eluyente. Esto daba 5R-5-etiloxazolidin-2-ona (35% de rendimiento, e.e. 82%). Las purezas ópticas se determinaron mediante GC usando una columna ChiralDEX G-TA (30 m x 0,25 mm x 0,25 m). Los datos de NMR eran idénticos a los de los compuestos de referencia racémicos sintetizados.

Ejemplo II

250 mmol de 2-etil-2-metiloxirano racémico (fórmula 1, $R_1 = Me$; $R_2 = Et$) se disolvieron en tampón de Tris- SO_4 500 mMol (pH 7,5), seguido por la adición de enzima purificada (1% en peso de halohidrina deshalogenasa HheC en tampón de Tris) y NaOCN 125 mMol. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (24°C) y se verificó mediante cromatografía de gases (GC). La reacción se detuvo después de 7 h y se extrajo tres veces añadiendo acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron. El producto en bruto se cromatografió sobre un gel de sílice 60 H usando pentano/ CH_2Cl_2 (4:6) como eluyente. Esto daba 5R-5-etil-5-metiloxazolidin-2-ona (40% de rendimiento, e.e. 97%). Las purezas ópticas se determinaron mediante GC usando una columna ChiralDEX G-TA (30 m x 0,25 mm x 0,25 m). Los datos de NMR eran idénticos a los de los compuestos de referencia racémicos sintetizados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una oxazolidinona ópticamente enriquecidas de la fórmula (2a) o (2b),
 5 haciendo reaccionar un epóxido de la fórmula (1) con un cianato en presencia de halohidrina deshalogenasa



30 en el que R1 y R2 se eligen independientemente entre sí de hidrógeno y grupos alquilo, grupos arilo, grupos aralquilo, grupos alquenilo y grupos cicloalquilo opcionalmente sustituidos, con la condición $R1 \neq R2$,

y recuperar la oxazolidinona ópticamente enriquecida.

35 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R1 y R2 se eligen del grupo -H, $-(CH_2)_n-CH_3$, con $n = 0$ a $n = 8$.

40 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la halohidrina deshalogenasa es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del N° ID SEC: 1 o uno de sus homólogos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura está entre 0 y 60°C.

ES 2 328 183 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF Aktiengesellschaft
 <120> Un procedimiento para la producción de oxazolidinas ópticamente enriquecidas
 <130> AE20051171/PF 57693
 <160> 2006 03 03
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> *Agrobacterium radiobacter*
 <400> 1

Met Ser Thr Ala Ile Val Thr Asn Val Lys His Phe Gly Gly Met Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Arg Leu Ser Glu Ala Gly His Thr Val Ala Gys His Asp
 20 25 30
 Glu Ser Phe Lys Gln Lys Asp Glu Leu Glu Ala Phe Ala Glu Thr Tyr
 35 40 45
 Pro Gln Leu Lys Pro Met Ser Glu Gln Glu Pro Ala Glu Leu Ile Glu
 50 55 60
 Ala Val Thr Ser Ala Tyr Gly Gln Val Asp Val Leu Val Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Ile Phe Ala Pro Glu Phe Gln Pro Ile Asp Lys Tyr Ala Val Glu Asp
 85 90 95
 Tyr Arg Gly Ala Val Glu Ala Leu Gln Ile Arg Pro Phe Ala Leu Val
 100 105 110
 Asn Ala Val Ala Ser Gln Met Lys Lys Arg Lys Ser Gly His Ile Ile
 115 120 125
 Phe Ile Thr Ser Ala Thr Pro Phe Gly Pro Trp Lys Glu Leu Ser Thr

ES 2 328 183 T3

	130		135		140
5	Tyr 145	Thr Ser Ala Arg Ala Gly Ala Cys Thr	Leu 155	Ala Asn Ala Leu Ser 160	
10	Lys	Glu Leu Gly Glu Tyr Asn Ile Pro Val Phe Ala Ile Gly Pro Asn 165 170 175			
15	Tyr	Leu His Ser Glu Asp Ser Pro Tyr Phe Tyr Pro Thr Glu Pro Trp 180 185 190			
20	Lys Thr Asn Pro Glu His Val Ala His Val Lys Lys Val Thr Ala Leu 195 200 205				
25	Gln Arg Leu Gly Thr Gln Lys Glu Leu Gly Glu Leu Val Ala Phe Leu 210 215 220				
30	Ala Ser Gly Ser Cys Asp Tyr Leu Thr Gly Gln Val Phe Trp Leu Ala 225 230 235 240				
35	Gly Gly Phe Pro Met Ile Glu Arg Trp Pro Gly Met Pro Glu 245 250				
40					
45					
50					
55					
60					
65					