



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 122017006144-5 A2**



**(22) Data do Depósito:** 25/03/2014

**(43) Data da Publicação Nacional:** 02/10/2014

**(54) Título:** ENZIMA TRANSAMINASE E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ÁCIDO (S)-3-AMINOMETIL-5-METIL-HEXANOICO

**(51) Int. Cl.:** C07D 307/60; C07B 53/00; C07C 229/04; C07C 59/74; C12N 9/10.

**(30) Prioridade Unionista:** 27/03/2013 US 61/805,786.

**(71) Depositante(es):** PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS.

**(72) Inventor(es):** SEBASTIEN DEBARGE; DAVID THOMAS ERDAM; PADRAIG MARY O'NEILL; RAJESH KUMAR; MICHAEL JOHN KARMILOWICZ.

**(86) Pedido PCT:** PCT IB2014060140 de 25/03/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/155291 de 02/10/2014

**(85) Data da Fase Nacional:** 24/03/2017

**(62) Pedido original do dividido:** BR112015024859-4 - 25/03/2014

**(57) Resumo:** ENZIMA TRANSAMINASE E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ÁCIDO (S)-3-AMINOMETIL-5-METIL-HEXANOICO A presente invenção se refere a uma enzima transaminase que apresenta a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1 e a um processo para a fabricação de ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II) ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, em que o dito processo compreende a etapa de tratar 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5H-2-furanona (IA) e uma amina com a dita enzima transaminase.

“ENZIMA TRANSAMINASE E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ÁCIDO (S)-3-AMINOMETIL-5-METIL-HEXANOICO”

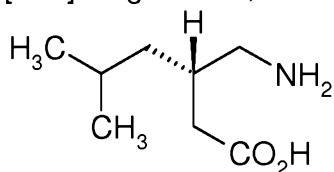
[001] Pedido dividido do BR 11 2015 024859 4, depositado em 25/03/2014.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere à fabricação de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5H-2-furanona e aos derivados da mesma para o uso na fabricação de ácido (S)-(+)-3-aminometil-5-metil-hexanoico (Pregabalina). A invenção ainda se refere a um processo aperfeiçoado para a conversão de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5H-2-furanona em Pregabalina. Pregabalina é um  $\gamma$ -aminoácido que exhibe afinidade de ligação à subunidade do canal de cálcio  $\alpha_2\delta$  humana.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

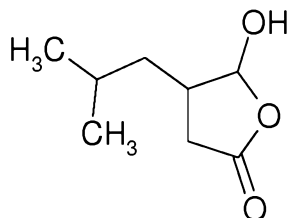
[003] Pregabalina, ou ácido (S)-(+)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II),



Pregabalina ((S)-II)

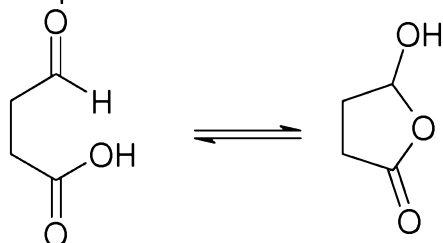
[004] é o agente de ativo em Lyrica®, que é aprovado para o tratamento de epilepsia, dor neuropática, fibromialgia e transtorno de ansiedade generalizado. Este exhibe atividade anticonvulsiva, conforme debatido na Patente U.S. 5.563.175, e atividade antinociceptiva, conforme debatido na Patente U.S. 6.001.876. É a hipótese de que a atividade farmacológica de Pregabalina (II) é o resultado de ligação à subunidade alfa-2-delta ( $\alpha_2\delta$ ) de um canal de cálcio. Pregabalina (II) também é descrita por apresentar utilidade em outras condições, tais como condições fisiológicas associadas com estimulantes psicomotores, inflamação, dano gastrointestinal, alcoolismo, insônia e vários transtornos psiquiátricos, incluindo ansiedade, depressão, mania e transtorno bipolar.

[005] Alguns métodos para fabricar Pregabalina foram divulgados. 5-Hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona ( $I^A$ ) foi identificada como um precursor útil.



( $I^A$ )

[006] Será avaliado que o composto ( $I^A$ ), em comum com um número dos outros compostos debatidos neste relatório, pode ser considerado o isômero ciclizado de um derivado de ácido 4-oxobutanoico. Os derivados de ácido 4-oxobutanoico podem existir como a forma de cadeia aberta ou como a forma cíclica.

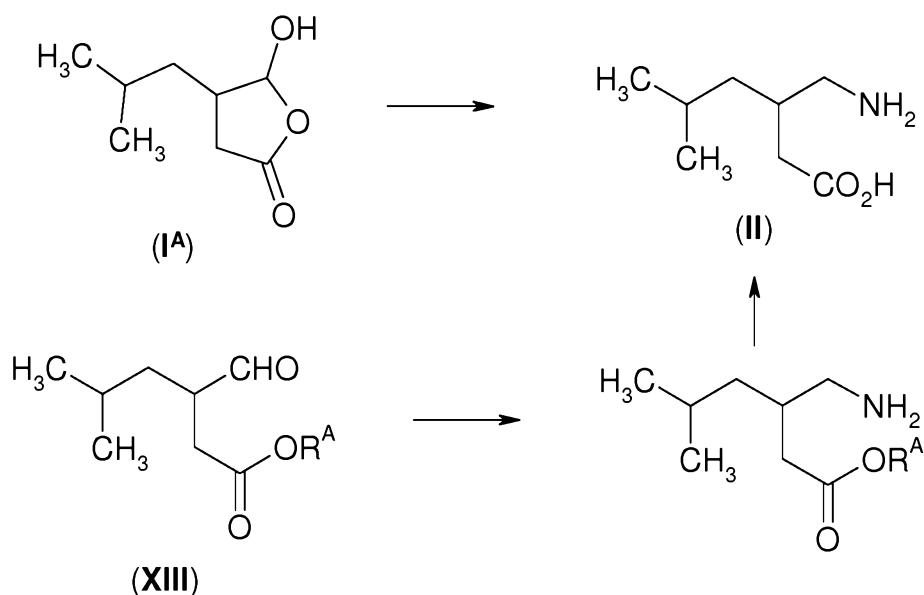


Isômero de  
"cadeia aberta"

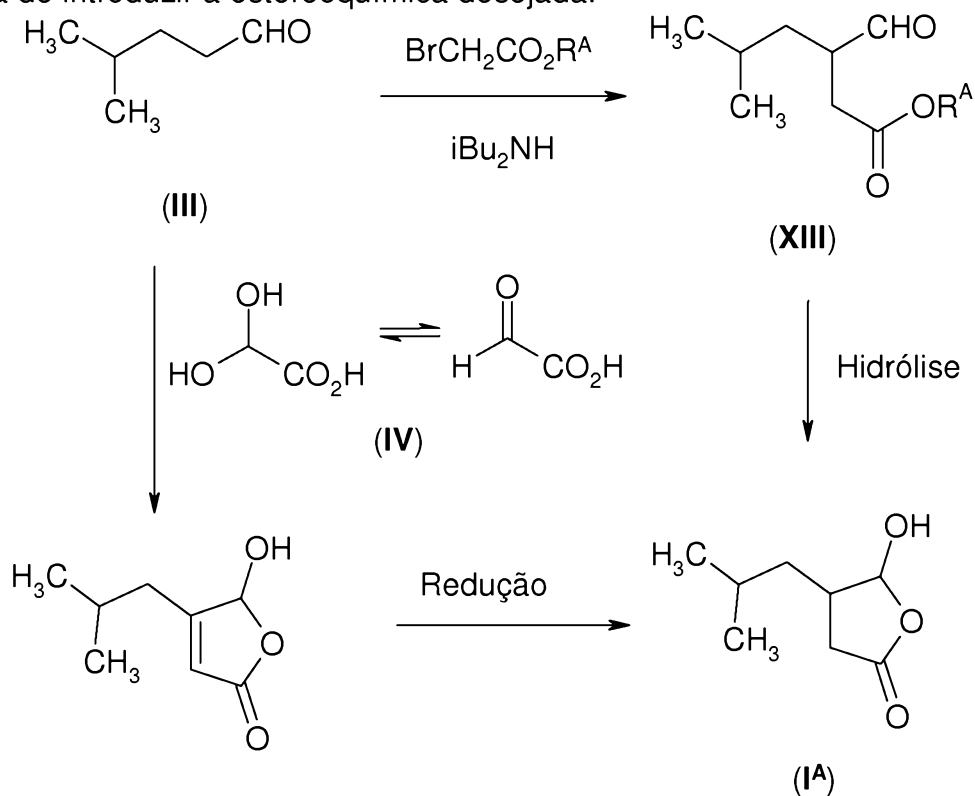
Isômero  
"cíclico"

[007] Estas duas formas isoméricas podem coexistir em equilíbrio e as contribuições relativas das duas formas dependerão da natureza química precisa da espécie.

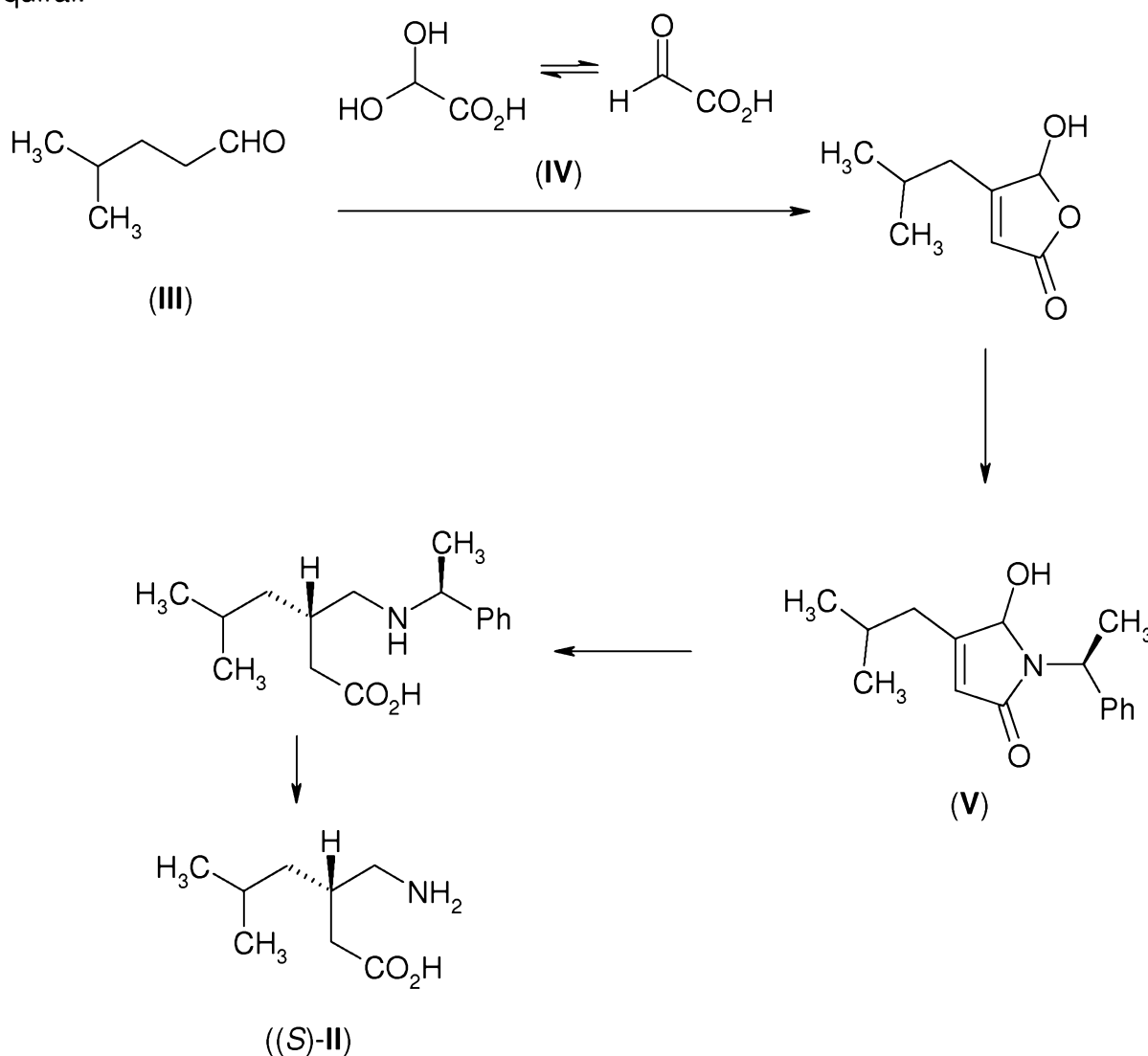
[008] O Pedido de Patente Internacional PCT/US2008/004699 (publicado como WO 2008/127646A2) propõe a conversão de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona ( $I^A$ ) ou um éster da forma isomérica aberta no anel (XIII, em que  $R^A$  é alquila) em (II) usando um produto químico ou uma aminação redutiva mediada por enzima. É sugerido que o uso de uma enzima transaminase fornecerá seletivamente o enantiômero ((*S*)-II) preferido.



[009]O éster (XIII) é preparado a partir de 4-metilpentanal (III) através da alquilação com um haloacetato apropriado na presença de di-isobutilamina. O precursor (IA) é preparado por hidrólise de éster de éster (XIII) ou por condensação de 4-metilpentanal (III) com ácido glicólico (IV) e redução subsequente da ligação dupla. O uso de uma redução mediada por enzima também é sugerida como uma maneira de introduzir a estereoquímica desejada.



[010] Pedido de Patente Internacional PCT/IN2010/000140 (publicado como WO 2011/086565) divulga um processo relacionado. O produto de condensação de 4-metilpentanal (III) e ácido glicólico (IV) é reagido com uma amina quiral, tal como  $\alpha$ -metilbenzilamina para fornecer uma pirrolona (V). A hidrogenação fornece algum grau de estereosseletividade e a desproteção fornece Pregabalina (II) na forma quiral.



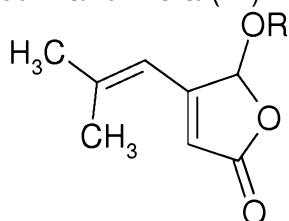
[011] Outras sínteses aperfeiçoadas de Pregabalina (II) são procuradas. É especialmente desejável fornecer um processo que é eficaz em custo e seguro. Em particular, é importante fornecer uma síntese de Pregabalina (II) que pode ser realizada em uma escala comercial, que utiliza materiais de partida e reagentes

facilmente disponíveis, baratos e seguros, e que evita a necessidade quanto a separações difíceis.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[012]A presente invenção fornece métodos aperfeiçoados para a fabricação de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) e os intermediários que são úteis nestes métodos aperfeiçoados.

[013]Em um primeiro aspecto A1, a invenção fornece um composto, de acordo com a fórmula (VI)



(VI)

[014]Em uma primeira forma de realização A1E1, a invenção fornece um composto, de acordo com a fórmula (VI), em que R é selecionado a partir de:

[015]hidrogênio,

[016]alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

[017]haloalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

[018]alcóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alquila (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),

[019]alquenila (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),

[020]cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[021]cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), em que o grupo cicloalquila pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[022]arila, que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[023]arilalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), em que o grupo arila pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[024]R<sup>1</sup>-C(O)-, e

[025]R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-;

[026]R<sup>1</sup> é selecionado a partir de:

[027]hidrogênio,

[028]alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

[029]haloalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

[030]alcóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alquila (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),

[031]alquenila (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),

[032]cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[033]cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), em que o grupo cicloalquila pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[034]arila, que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), e

[035]arilalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), em que o grupo arila pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[036]e R<sup>2</sup> é selecionado a partir de:

[037]alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

[038]haloalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

[039]alcóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alquila (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),

[040]alquenila (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),

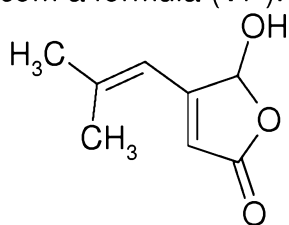
[041]cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[042]cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), em que o grupo cicloalquila pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

[043]arila, que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), e

[044]arilalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), em que o grupo arila pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de halo, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) e alquilóxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>).

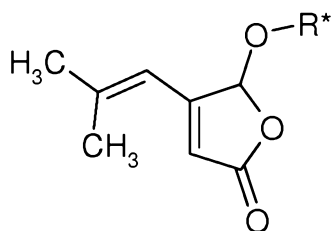
[045]Em uma outra forma de realização A1E2, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A1E1, em que R é hidrogênio, tal que o composto da fórmula (VI) é 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona, de acordo com a fórmula (VI<sup>A</sup>).



(VI<sup>A</sup>)

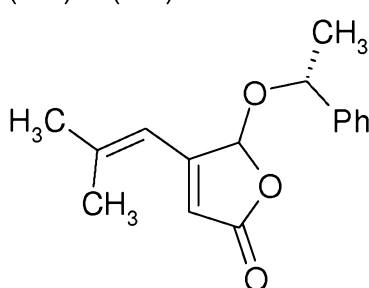
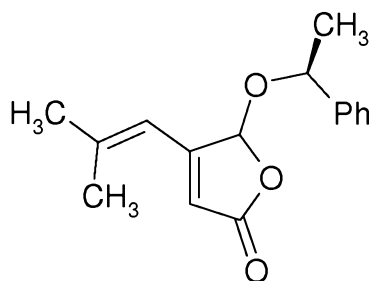
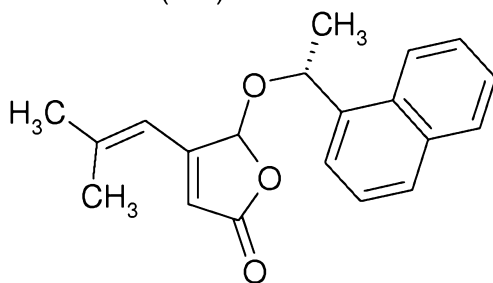
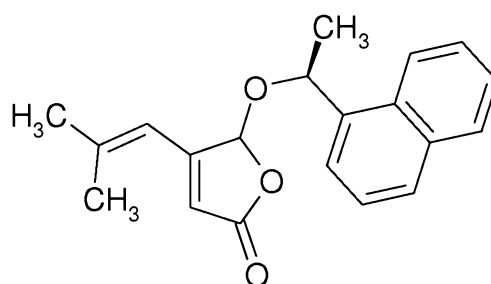
[046]Em uma outra forma de realização A1E3, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A1E1, da fórmula (VI<sup>B</sup>)

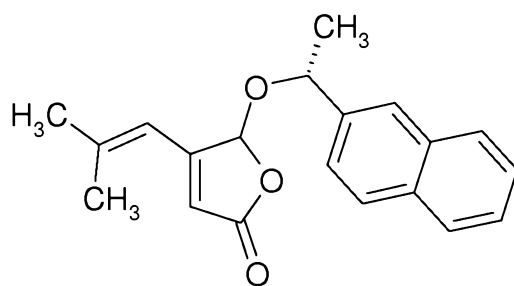
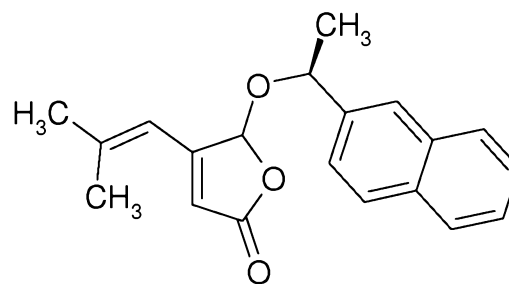
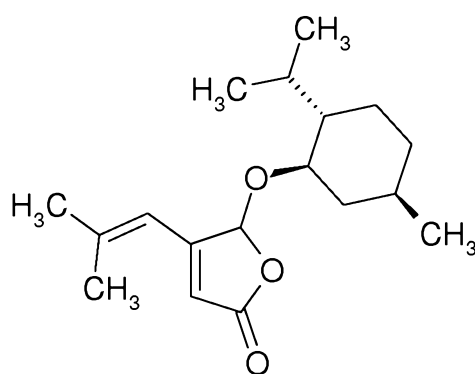
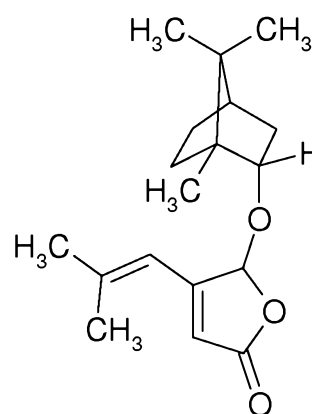


(VI<sup>B</sup>)

[047]em que R\* é um grupo hidrocarboneto (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>) quiral.

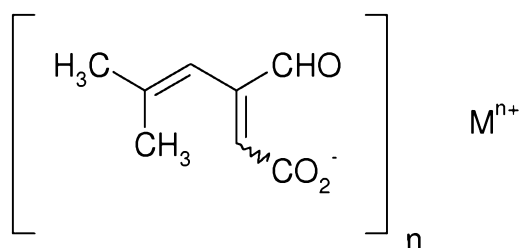
[048]Em uma outra forma de realização A1E4, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A1E3, em que R\* é selecionado a partir de (*R*)- ou (*S*)- $\alpha$ -metilbenzila, (*R*)- ou (*S*)-1-(1-naftil)etila, (*R*)- ou (*S*)-1-(2-naftil)etila, mentila e bornila, tal que o composto da fórmula (VI) é o composto da fórmula (VI<sup>C</sup>) a (VI<sup>K</sup>).

(VI<sup>C</sup>)(VI<sup>D</sup>)(VI<sup>E</sup>)(VI<sup>F</sup>)

(VI<sup>G</sup>)(VI<sup>H</sup>)(VI<sup>J</sup>)(VI<sup>K</sup>)

[049]Em uma outra forma de realização A1E5, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A1E1, em que R é R<sup>1</sup>-C(O)- ou R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>- e R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são grupos hidrocarboneto (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>) quirais.

[050]Em um outro aspecto A2, a invenção fornece um composto da fórmula (IX)



(IX)

[051]O composto da fórmula (IX) pode existir como o isômero geométrico (*E*) ou (*Z*) ou como uma mistura dos dois isômeros geométricos.

[052]Em uma primeira forma de realização A2E1, a invenção fornece um

composto da fórmula (IX), em que:

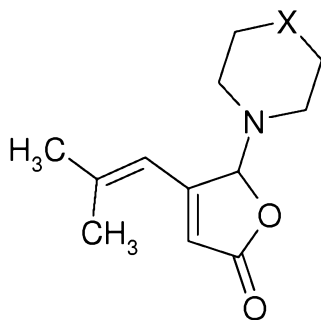
[053]  $n$  é 1 e  $M^+$  é selecionado a partir de  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$ , (alquila ( $C_1-C_3$ )) $NH_3^+$ , (alquila ( $C_1-C_3$ )) $_2NH_2^+$ , (alquila ( $C_1-C_3$ )) $_3NH^+$  e (alquila ( $C_1-C_3$ )) $_4N^+$ ; ou

[054]  $n$  é 2 e  $M^{2+}$  é selecionado a partir de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ .

[055] Em uma outra forma de realização A2E2, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A2E1, em que  $n$  é 1 e  $M^+$  é selecionado a partir de  $NH_4^+$  e (alquila ( $C_1-C_3$ )) $NH_3^+$ .

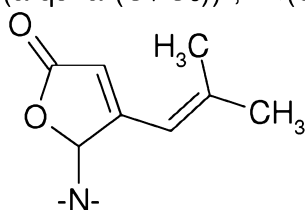
[056] Em uma outra forma de realização A2E3, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A2E1, em que  $n$  é 1 e  $M^+$  é selecionado a partir de  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $K^+$ .

[057] Em um outro aspecto A3, a invenção fornece um composto da fórmula (VII).



(VII)

[058] Em uma primeira forma de realização A3E1, a invenção fornece um composto da fórmula (VII), em que -X- representa uma ligação única,  $-CH_2-$ ,  $-O-$ ;  $-NH-$ ,  $-N(\text{alquila } (C_1-C_3))-$ ,  $-N(\text{benzil})-$ , ou



[059] Em uma outra forma de realização A3E2, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A3E1, selecionado a partir de:

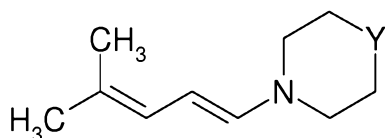
[060] 4-(2-metilpropenil)-5-pirrolidin-1-il-5H-furan-2-ona;

[061]4-(2-metilpropenil)-5-piperidin-1-il-5*H*-furan-2-ona;

[062]4-(2-metilpropenil)-5-morfolin-4-il-5*H*-furan-2-ona; e

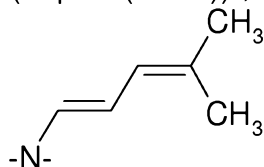
[063]1,4-*bis*-(4-(2-metilpropenil)-5*H*-furan-2-on-5-il)piperazina.

[064]Em um outro aspecto A4, a invenção fornece um composto da fórmula (VIII).



(VIII)

[065]Em uma primeira forma de realização A4E1, a invenção fornece um composto da fórmula (VIII), em que -Y- representa uma ligação única, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(benzil)-, ou



[066]Em uma outra forma de realização A4E2, a invenção fornece um composto, de acordo com forma de realização A4E1, selecionado a partir de:

[067]4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)morfolina;

[068]1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-piperazina,

[069]1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-4-metilpiperazina,

[070]4-etil-1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-piperazina,

[071]4-benzil-1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-piperazina, e

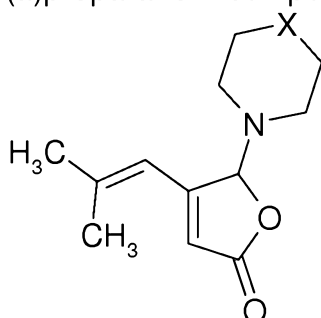
[072]1,4-*bis*-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)piperazina.

[073]Em um outro aspecto A5, a invenção fornece um processo para a fabricação de o composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) compreendendo a etapa de tratar um composto da fórmula (VII) com água na presença de um catalisador de ácido.

[074]Em uma primeira forma de realização A5E1, a invenção fornece um processo para a fabricação do composto da fórmula (VI<sup>A</sup>), compreendendo as etapas

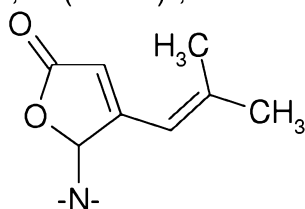
de:

(a) preparar um composto da fórmula (VII)



(VII)

[075] em que -X- representa uma ligação única, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(benzil)-, ou



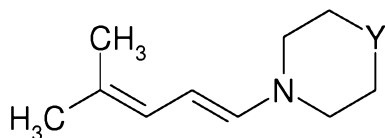
e

[076] (b) tratar o composto da fórmula (VII) com água na presença de um catalisador de ácido.

[077] Em uma outra forma de realização A5E2, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A5E1, em que o composto da fórmula (VII) a partir da etapa (a) é isolado antes da etapa de hidrólise (b).

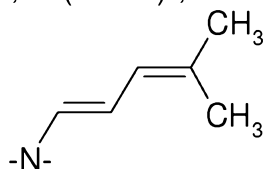
[078] Em uma outra forma de realização A5E3, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A5E1, em que a etapa de hidrólise (b) é realizada diretamente após a etapa (a), tal que o composto da fórmula (VII) ou (VII<sup>B</sup>) não é isolado antes da etapa de hidrólise (b).

[079] Em uma outra forma de realização A5E4, a invenção fornece um processo, de acordo com as formas de realização A5E1, A5E2 ou A5E3, em que o composto da fórmula (VII) é preparado através do tratamento de um composto da fórmula (VIII)



(VIII)

[080]em que -Y- representa uma ligação única, -CH<sub>2</sub>-, -O-; -NH-, -N(alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(benzil)-, ou



[081]com ácido glioilico ou seu hidrato.

[082]Em um outro aspecto A6, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que R é exceto hidrogênio, R<sup>1</sup>-C(O)-, e R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, compreendendo a etapa de tratar um composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) com um álcool R-OH na presença de um catalisador de ácido.

[083]Em um forma de realização A6E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI) em que R é exceto hidrogênio, R<sup>1</sup>-C(O)-, e R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, compreendendo as etapas de:

(a)preparar um composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) usando um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A5E1, A5E2, A5E3 e A5E4, conforme definido acima; e

(b)tratar o composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) com um álcool R-OH na presença de um catalisador de ácido.

[084]Em um outro aspecto A7, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que R é exceto hidrogênio, R<sup>1</sup>-C(O)- e R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, compreendendo a etapa de tratar um composto da fórmula (VII) com um álcool R-OH na presença de ácido estequiométrico.

[085]Em um forma de realização A7E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que R é exceto hidrogênio,

$R^1-C(O)-$ , e  $R^2-SO_2-$ , compreendendo as etapas de:

- (a) preparar um composto da fórmula (VII); e
- (b) tratar o composto da fórmula (VII) com um álcool  $R-OH$  na presença de ácido estequiométrico.

[086] Em um outro aspecto A8, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que  $R$  é  $R^1-C(O)-$ , compreendendo a etapa de tratar um composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) com um cloreto de ácido  $R^1-C(O)-Cl$  ou anidrido de ácido  $(R^1-C(O))_2O$ .

[087] Em um forma de realização A8E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que  $R$  é  $R^1-C(O)-$ , compreendendo as etapas de:

(a) preparar um composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) usando um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A5E1, A5E2, A5E3 e A5E4, conforme definido acima; e

(b) tratar o composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) com um cloreto de ácido  $R^1-C(O)-Cl$  ou anidrido de ácido  $(R^1-C(O))_2O$ .

[088] Em um outro aspecto A9, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que  $R$  é  $R^2-SO_2-$ , compreendendo a etapa de tratar um composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) com um cloreto de sulfonila  $R^2-SO_2-Cl$ .

[089] Em um forma de realização A9E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de um composto da fórmula (VI), em que  $R$  é  $R^2-SO_2-$ , compreendendo as etapas de:

(a) preparar um composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) usando um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A5E1, A5E2, A5E3 e A5E4, conforme definido acima; e

(b) tratar o composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) com um cloreto de sulfonila  $R^2-SO_2-Cl$ .

[090] Em um outro aspecto A10, a invenção fornece um processo para a

fabricação de um derivado de enamina de 4-metil-2-pentenal.

[091]Em uma primeira forma de realização A10E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de um derivado de enamina de 4-metil-2-pentenal compreendendo reagir acetaldeído com isobutiraldeído na presença de uma amina adequada.

[092]Em uma outra forma de realização A10E2, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A10E1, em que a amina adequada é uma amina secundária.

[093]Em uma outra forma de realização A10E3, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A10E2, em que a amina secundária é selecionada a partir de: (alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>))<sub>2</sub>NH, pirrolidina, piperidina, morfolina, piperazina, N-metilpiperazina, N-etilpiperazina e N-benzilpiperazina.

[094]Em uma outra forma de realização A10E4, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A10E3, em que a amina secundária é selecionada a partir de pirrolidina, piperidina, morfolina e piperazina.

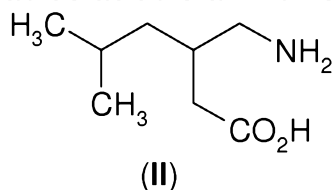
[095]Em uma outra forma de realização A10E5, a invenção fornece um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A10E1, A10E2, A10E3 e A10E4, em que a reação é realizada na presença de um catalisador de ácido.

[096]Em uma outra forma de realização A10E6, a invenção fornece um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A10E1, A10E2, A10E3, A10E4 e A10E5, em que o isobutiraldeído é combinado com a amina adequada antes da adição do acetaldeído.

[097]Em uma outra forma de realização A10E6, a invenção fornece um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A10E1, A10E2, A10E3, A10E4 e A10E5, em que o isobutiraldeído e acetaldeído são adicionados ao vaso de reação simultaneamente.

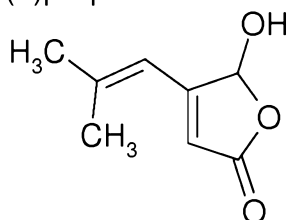


[098]Em um outro aspecto A11, a invenção fornece um processo para a fabricação de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II).

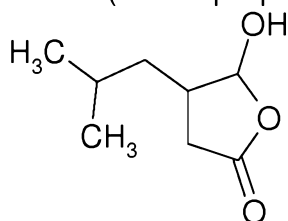


[099]Em uma primeira forma de realização A11E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo as etapas de:

(a)preparar 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona (VI<sup>A</sup>)



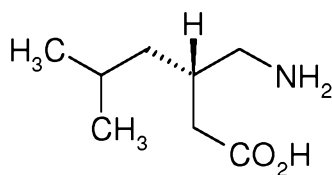
[0100](b) converter a dita 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona (VI<sup>A</sup>) em 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>)



e

[0101](c) converter a dita 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) em ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II).

[0102]Em uma outra forma de realização A11E2, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A11E1, em que o ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II) é ácido (*S*)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((*S*)-II).



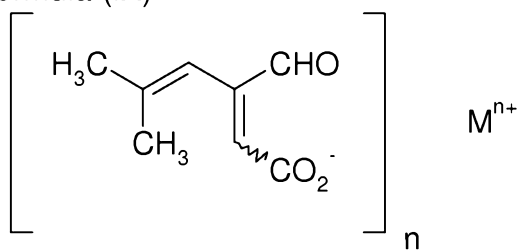
((S)-II)

[0103]em que o dito ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico tem um excesso enantiomérico de pelo menos 80 %.

[0104]Em uma outra forma de realização A11E3, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A11E1 ou A11E2, em que a etapa (a) compreende um processo, de acordo com as formas de realização A5E1, A5E2, A5E3 ou A5E4, conforme descrito acima.

[0105]Em uma outra forma de realização A11E4, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A11E1, A11E2 ou A11E3, em que a etapa (b) compreende as etapas de:

[0106](b1) tratar a 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona (VI<sup>A</sup>) com um óxido, hidróxido, carbonato ou bicarbonato de metal, amônia, uma mono- di- ou tri-alquilamina (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), ou um hidróxido de tetra-alquilamônio (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) para formar um sal da fórmula (IX)



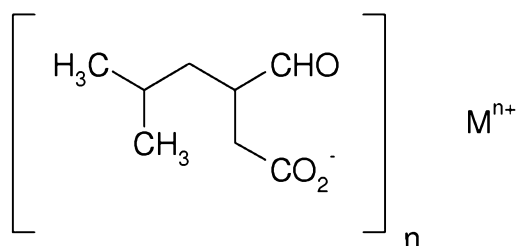
(IX)

[0107]em que:

[0108] $n$  é 1 e  $M^+$  é selecionado a partir de  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$ , (alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)) $NH_3^+$ , (alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)) $_2NH_2^+$ , (alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)) $_3NH^+$  e (alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)) $_4N^+$ ; ou

[0109] $n$  é 2 e  $M^{2+}$  é selecionado a partir de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ;

[0110](b2) hidrogenar o sal da fórmula (IX) para obter um sal da fórmula (X)



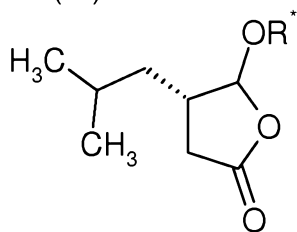
(X) ; e

[0111](b3) tratar o sal da fórmula (X) com um ácido.

[0112]Em uma outra forma de realização A11E5, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A11E1, A11E2 ou A11E3, em que a etapa (b) compreende as etapas de:

[0113](b1) converter a 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona (VI<sup>A</sup>) em um composto da fórmula (VI), conforme definido na forma de realização A1E3, em que R é um grupo hidrocarboneto (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>) quirál;

[0114](b2) hidrogenar o composto da fórmula (VI) para obter um composto da fórmula (XI)



(XI)

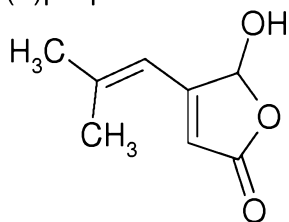
[0115]em que R\* é um grupo hidrocarboneto (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>) quirál; e

[0116](b3) tratar o composto da fórmula (XI) com um ácido para fornecer ((S)-I<sup>A</sup>).

[0117]Em um outro aspecto A12, a invenção fornece um processo adicional para a fabricação de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II).

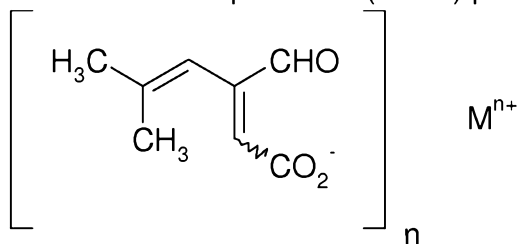
[0118]Em uma primeira forma de realização A12E1, a invenção fornece um processo para a fabricação de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo as etapas de:

(a) preparar 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona (VI<sup>A</sup>)



(VI<sup>A</sup>)

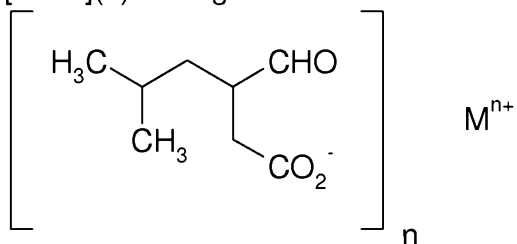
[0119](b) tratar a 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5*H*-2-furanona (VI<sup>A</sup>) com amônia ou um mono-alquilamina (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) para formar um sal da fórmula (IX<sup>A</sup>)



(IX<sup>A</sup>)

[0120]em que n é 1 e M<sup>+</sup> é selecionado a partir de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e (alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>

[0121](c) hidrogenar o sal da fórmula (IX<sup>A</sup>) para obter um sal da fórmula (X<sup>A</sup>)

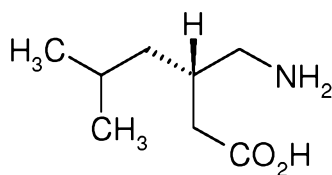


(X<sup>A</sup>)

; e

[0122](d) tratar o sal da fórmula (X<sup>A</sup>) com uma enzima transaminase ou uma amina oxidase/imina redutase para fornecer ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II).

[0123]Em uma outra forma de realização A12E2, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A12E1, em que o ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II) é ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II)



((S)-II)

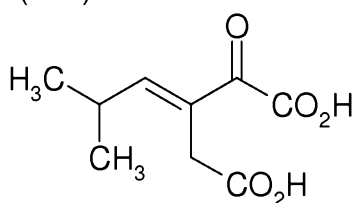
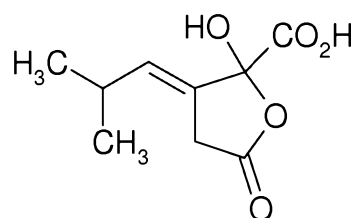
[0124]em que o dito ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico tem um excesso enantiomérico de pelo menos 80 %.

[0125]Em uma outra forma de realização A12E3, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A12E1 ou A12E2, em que a etapa (a) compreende um processo, de acordo com as formas de realização A5E1, A5E2, A5E3 ou A5E4, conforme descrito acima.

[0126]Em um outro aspecto A13, a invenção fornece um processo adicional para a fabricação de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>).

[0127]Em uma primeira forma de realização A13E1, a invenção fornece um processo adicional para a fabricação de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) que compreende as etapas de:

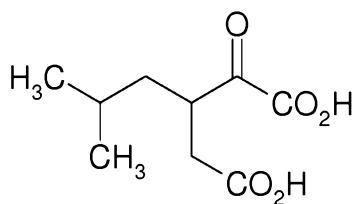
(a) obter ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico (XII<sup>A</sup>) ou seu isômero ciclizado (XII<sup>B</sup>)

(XII<sup>A</sup>)(XII<sup>B</sup>)

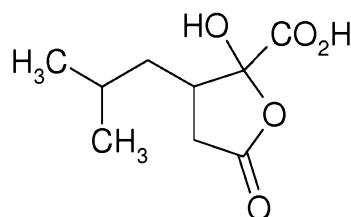
, e

[0128](b) reduzir sequencial ou simultaneamente a ligação dupla carbono-carbono e decarboxilar o grupo funcional α-ceto ácido.

[0129]Em uma outra forma de realização A13E2, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A13E1, em que a ligação dupla carbono-carbono é reduzida para fornecer ácido 3-isobutil-2-oxopentanodioico (XV) ou seu isômero ciclizado (XV<sup>A</sup>)

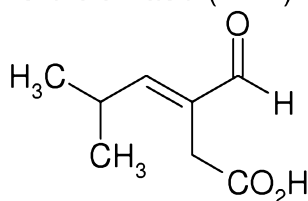


(XV)

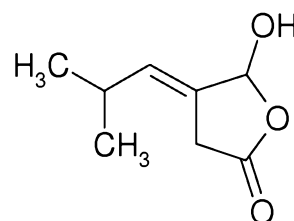
(XV<sup>A</sup>)

[0130]antes da decarboxilação do grupo funcional  $\alpha$ -ceto ácido.

[0131]Em uma outra forma de realização A13E3, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A13E1, em que o grupo funcional  $\alpha$ -ceto ácido é decarboxilado para fornecer ácido 3-formil-5-metil-3-pentenoico (XVI) ou seu isômero ciclizado (XVI<sup>A</sup>)



(XVI)

(XVI<sup>A</sup>)

[0132]antes da redução da ligação dupla carbono-carbono.

[0133]Em uma outra forma de realização A13E4, a invenção fornece um processo, de acordo com forma de realização A13E1, em que o grupo funcional  $\alpha$ -ceto ácido é decarboxilado e a ligação dupla carbono-carbono é simultaneamente reduzida.

[0134]Em uma outra forma de realização A13E5, a invenção fornece um processo, de acordo com as formas de realização A13E1, A13E2, A13E3 ou A13E4, em que a decarboxilação é realizada na presença de uma enzima decarboxilase.

[0135]Em uma outra forma de realização A13E6, a invenção fornece um processo, de acordo com as formas de realização A13E1, A13E2, A13E3, A13E4 ou A13E5, em que a redução da ligação dupla carbono-carbono é realizada na presença de uma enzima enoato redutase.

[0136]Em um outro aspecto A14, a invenção fornece um composto

selecionado a partir de:

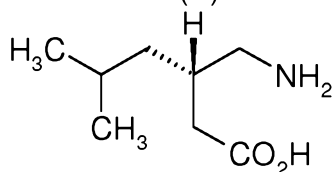
[0137]ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico;

[0138]ácido 3-isobutil-2-oxopentanodioico; e

[0139]ácido 3-formil-5-metil-3-pentenoico,

[0140]ou um sal, éster alquílico (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ou isômero ciclizado do mesmo.

[0141]Em um outro aspecto A15, a invenção fornece um processo para a fabricação de ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II)



((S)-II)

[0142]ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo as etapas de:

(a)fabricar 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) usando um processo, de acordo com qualquer uma das formas de realização A13E1, A13E2, A13E3, A13E4, A13E5 ou A13E6, conforme definido acima, e

(b)converter a dita 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona em ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico.

[0143]Em um outro aspecto A16, a invenção fornece um processo para converter ácido (R)-3-aminometil-5-metil-hexanoico em ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico compreendendo tratar o ácido (R)-3-aminometil-5-metil-hexanoico com uma enzima transaminase ou uma enzima amina oxidase/imina redutase.

[0144]Em um outro aspecto A17, a invenção fornece um processo para aumentar a proporção de ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico em uma mistura de ácido (R)- e (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico compreendendo tratar a mistura com uma enzima transaminase ou uma enzima amina oxidase/imina redutase.

[0145]Em um outro aspecto A18, a invenção fornece uma enzima transaminase que é útil para a conversão de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-

5H-2-furanona (I<sup>A</sup>) em Pregabalina.

[0146] Em uma primeira forma de realização A18E1, a invenção fornece uma enzima transaminase que apresenta uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 95 % de homologia à sequência de aminoácidos

[0147] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHX<sup>27</sup>RGTVVVTHGEGPYX<sup>41</sup>VD  
VX<sup>45</sup>GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLS  
EKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRX<sup>147</sup>NAYH  
GVTAVSASMTGX<sup>163</sup>PX<sup>165</sup>NSVFGLPLPGFVHLX<sup>180</sup>CPHYWRYGEEGETEEQFVARL  
ARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVIC  
GFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTAGFFPVGAVILGPELX<sup>304</sup>KRLETAIEAIEEF  
PHGFTAX<sup>324</sup>GHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYR  
GIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSX<sup>401</sup>RIANTCX<sup>408</sup>DLGLICX<sup>415</sup>X<sup>416</sup>X<sup>417</sup>GQSVI  
LX<sup>424</sup>PPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 1)

[0148] em que

[0149] X<sup>27</sup> é selecionado a partir de glutamina (Q) e ácido glutâmico (E);

[0150] X<sup>41</sup> é selecionado a partir de isoleucina (I) e valina (V);

[0151] X<sup>45</sup> é selecionado a partir de asparigina (N) e histidina (H);

[0152] X<sup>147</sup> é selecionado a partir de asparigina (N) e glutamina (Q);

[0153] X<sup>163</sup> é selecionado a partir de leucina (L) e metionina (M);

[0154] X<sup>165</sup> é selecionado a partir de tirosina (Y) e histidina (H);

[0155] X<sup>180</sup> é selecionado a partir de treonina (T); glicina (G) e serina (S);

[0156] X<sup>304</sup> é selecionado a partir de alanina (A) e serina (S);

[0157] X<sup>324</sup> é selecionado a partir de glicina (G) e serina (S);

[0158] X<sup>401</sup> é selecionado a partir de lisina (K) e ácido glutâmico (E);

[0159] X<sup>408</sup> é selecionado a partir de treonina (T) e glutamina (Q);

[0160] X<sup>415</sup> é selecionado a partir de serina (S) e alanina (A);

[0161] X<sup>416</sup> é selecionado a partir de prolina (P) e alanina (A);



[0162]X<sup>417</sup> é selecionado a partir de leucina (L) e metionina (M); e

[0163]X<sup>424</sup> é selecionado a partir de cisteína (C) e serina (S).

[0164]Em uma outra forma de realização A18E2, a invenção fornece uma enzima transaminase, de acordo com forma de realização A18E1, que apresenta a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1.

[0165]Em uma outra forma de realização A18E3, a invenção fornece uma enzima transaminase, de acordo com forma de realização A18E1 ou A18E2, em que:

[0166]X<sup>27</sup> é ácido glutâmico (E);

[0167]X<sup>147</sup> é glutamina (Q);

[0168]X<sup>165</sup> é histidina (H);

[0169]X<sup>304</sup> é serina (S);

[0170]X<sup>324</sup> é glicina (G);

[0171]X<sup>401</sup> é lisina (K);

[0172]X<sup>408</sup> é glutamina (Q);

[0173]X<sup>416</sup> é alanina (A);

[0174]X<sup>417</sup> é metionina (M); e

[0175]X<sup>424</sup> é serina (S).

[0176]Em uma outra forma de realização A18E4, a invenção fornece uma enzima transaminase, de acordo com forma de realização A18E2, que apresenta uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de:

[0177]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTA  
VSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPV

GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
ALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 2);

[0178]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTA  
VSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
ALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 3);

[0179]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
ALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 4);

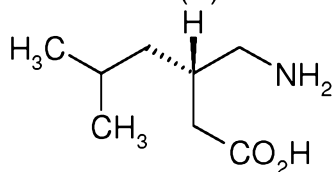
[0180]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGMPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQ  
REGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNT  
WGCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGH

PVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEA  
VKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDK  
LEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 5);

[0181]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLE  
KALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 6); e

[0181]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVH  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLE  
KALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 7).

[0182]Em um outro aspecto A19, a invenção fornece um processo para a  
fabricação de ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II)



((S)-II)

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo a etapa

de tratar 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) e uma amina com uma enzima transaminase, de acordo com qualquer uma das formas de realização A18E1, A18E2, A18E3 e A18E4.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

[0183]O termo “alquila” significa um radical de hidrocarboneto de cadeia reta ou cadeia ramificada saturado alifático contendo o número especificado de átomos de carbono. Exemplos de radicais alquila incluem metila, etila, *n*-propila, isopropila, *n*-butila, isobutila, *sec*-butila, *terc*-butila, neopentila e *n*-hexila.

[0184]O termo “alcóxi” significa um grupo constituído de um grupo alquila, conforme definido acima, conectado a um átomo de oxigênio. Exemplos de grupos alcóxi incluem metóxi, etóxi e isopropóxi.

[0185]O termo “alcóxi-alquila” significa um radical de hidrocarboneto de cadeia reta ou cadeia ramificada saturado alifático em que um grupo alcóxi é substituído no lugar de um átomo de alquil hidrogênio. Um exemplo de um grupo alcóxi-alquila é 2-metoxietila.

[0186]O termo “haloalquila” significa um grupo alquila, conforme definido acima, em que um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por flúor, cloro, bromo ou iodo. Quando mais do que um átomo de hidrogênio é substituído, a substituição de átomos de halogênio pode ser a mesma ou diferente. Exemplos de grupos haloalquila incluem fluorometila, difluorometila, trifluorometila, clorodifluorometila, 2,2,2-trifluoroetila e 3-bromopropila.

[0187]O termo “arila” significa um grupo fenila ou naftila.

[0188]O termo “aril-alquila” significa um radical de hidrocarboneto de cadeia reta ou cadeia ramificada saturado alifático, em que um grupo arila é substituído no lugar de um átomo de alquil hidrogênio. Um exemplo de um grupo aril-alquila é benzila.

[0189]O termo “cicloalquila” significa um anel carbocíclico saturado

monocíclico ou policíclico contendo o número especificado de átomos de carbono. Exemplos de grupos cicloalquila monocíclicos incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila e ciclo-hexila. Exemplos de grupos cicloalquila policíclicos incluem biciclo[2,2,1]heptila e biciclo[3,2,1]octila.

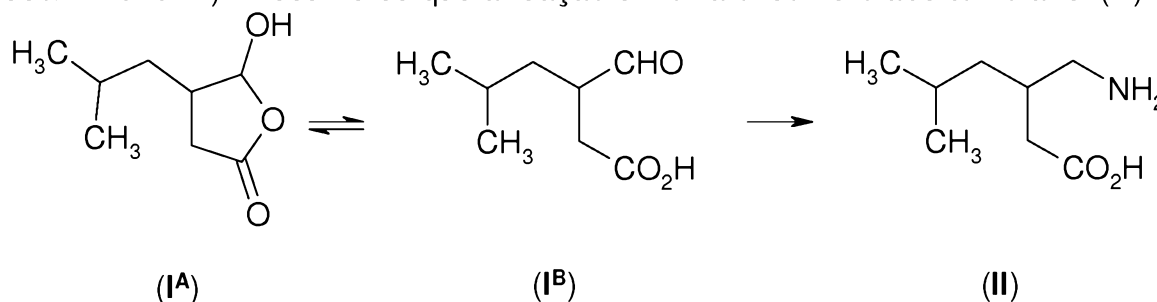
[0190]O termo “opcionalmente substituído” com referência a um grupo alquila ou arila significa que um átomo de hidrogênio do grupo alquila ou arila pode ser substituído por um dos grupos listados. A substituição pode ser feita em qualquer posição dentro do grupo alquila ou arila. Quando a substituição opcional é com “um ou mais grupos”, então qualquer número de átomos de hidrogênio do grupo alquila ou arila, até um máximo igual ao número de hidrogênios presentes no grupo alquila ou arila, pode ser substituído, e cada substituição é independente das outras.

[0191]O termo “excesso enantiomérico”, algumas vezes abreviado como “e.e.”, é uma medição, para uma dada amostra, do excesso de um enantiômero em excesso de seu antípoda e é expressado como uma porcentagem. O excesso enantiomérico é definido como:

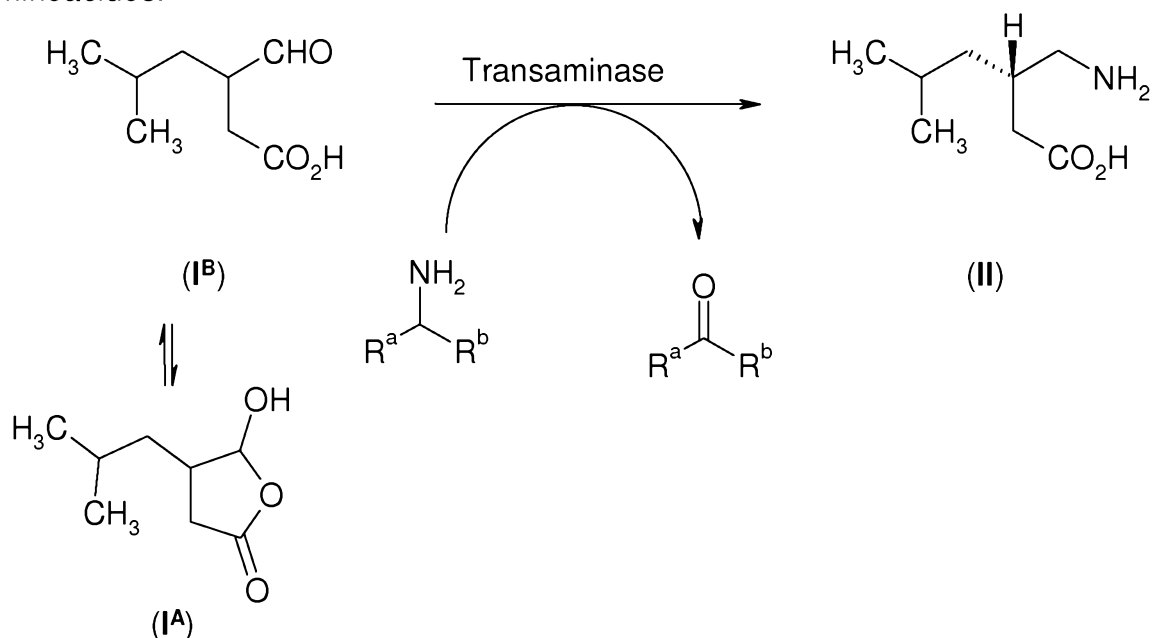
$$[0192]100 \times (er - 1)/(er + 1)$$

[0193]onde “er” é a razão do enantiômero mais abundante para o enantiômero menos abundante.

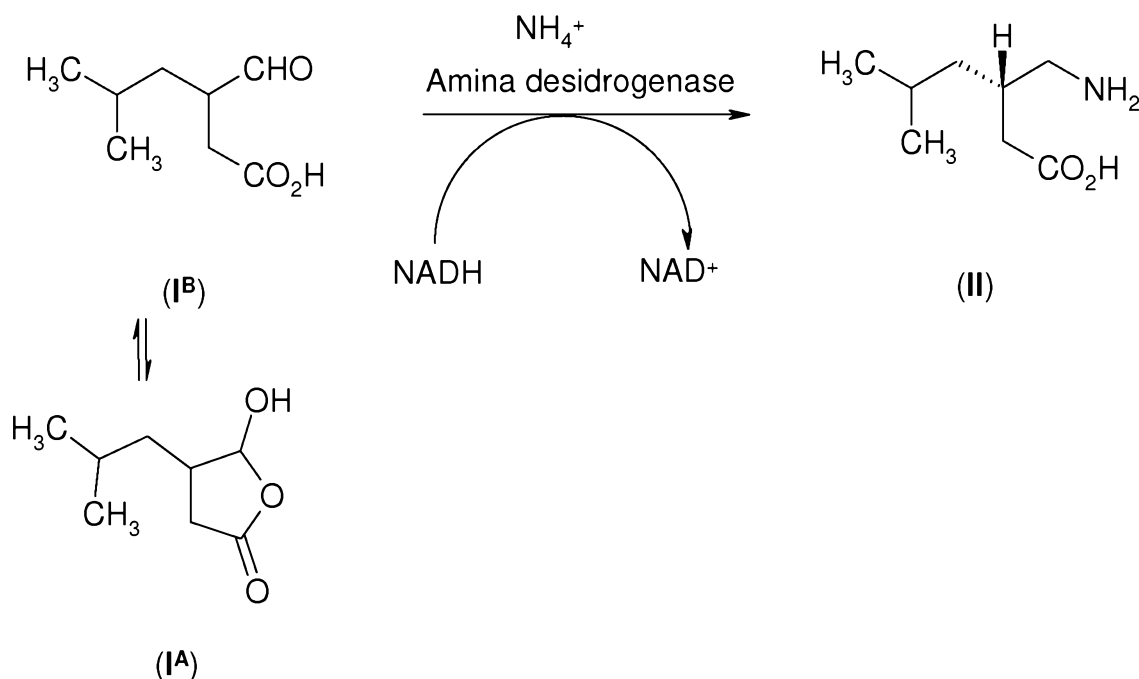
[0194]5-Hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (*I<sup>A</sup>*) é um intermediário conveniente na fabricação de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (*II*). O tratamento da forma racêmica (*I<sup>A</sup>*) com amônia na presença de um agente redutor químico fornece ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico racêmico ((*R/S*)-*II*) (veja o WO 2008/127646A2). Presume-se que a reação envolva o isômero aberto no anel (*I<sup>B</sup>*).



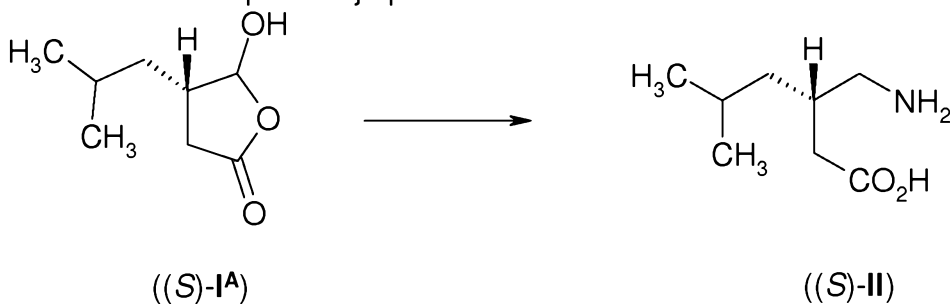
[0195] A aminação redutiva com um doador de amina na presença de uma enzima transaminase pode fornecer ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico enantiomericamente enriquecido. Doadores de amina adequados são aminas primárias, tais como mono-alquilaminas, particularmente, isopropilamina e  $\alpha$ -aminoácidos.



[0196] A reação de (I<sup>A</sup>) com uma amina desidrogenase/imina redutase adequada na presença de amônia também pode ser uma via adequada à pregabalina. Um cofator, tal como NADH ou NADPH, pode ser necessário em uma quantidade estequiométrica, ou uma segunda oxidoredutase, tal como formiato desidrogenase, pode ser incluída para reciclar o cofator.



[0197] Onde a di-hidrofuranona (IA) tem uma estereoquímica definida na posição C-4, esta estereoquímica pode ser preservada durante a reação de aminação redutiva. Visto que Pregabalina tem a estereoquímica (S), pode ser preferido ter esta estereoquímica já presente na di-hidrofuranona.

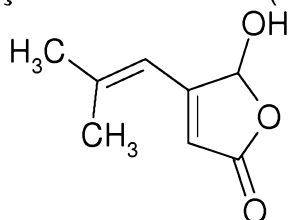


[0198] Alternativamente, a di-hidrofuranona (IA) pode ser usada como na forma racêmica. O estereoisômero desejado do produto depois pode ser obtido através da realização da reação de aminação redutiva sob condições que levam em consideração a formação estereosseletiva de um enantiômero único, tal como através da realização da transformação na presença de uma enzima transaminase, ou submetendo o produto a uma etapa de resolução separada, tal como através de cristalização com um ácido ou base quiral.

[0199] A di-hidrofuranona (IA) pode ser convenientemente preparada na

forma racêmica ou forma enantiomericamente enriquecida usando os métodos apresentados abaixo.

[0200] Em um primeiro método, a di-hidrofuranona ( $I^A$ ) é preparada através da redução de 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona ( $VI^A$ ).

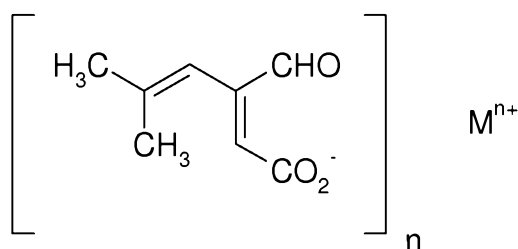


( $VI^A$ )

[0201] A redução pode ser convenientemente realizada através de hidrogenação na presença de um catalisador adequado. Catalisadores adequados incluem catalisadores homogêneos e heterogêneos. O catalisador tipicamente compreende um metal de transição, tal como paládio, platina, ródio, rutênio ou níquel, ou um sal ou óxido do mesmo. Catalisadores heterogêneos incluem metais finamente divididos e metais sustentados por substrato e óxidos de metal, onde o substrato pode ser carbono, sílica, alumina ou qualquer outro material inerte adequado. Catalisadores homogêneos incluem complexos de ligante de fosfina de metais de transição. Quando o ligante de fosfina é quiral, então o catalisador é quiral. Quando um catalisador aquiral é usado, então o produto é a di-hidrofuranona racêmica ( $I^A$ ). O uso de um catalisador quiral pode fornecer a di-hidrofuranona ( $I^A$ ) em uma maneira enantiosseletiva.

[0202] A seletividade da reação de hidrogenação e o rendimento global podem ser aperfeiçoados quando a reação é realizada em um meio alcalino. Sem limitar a invenção a uma teoria, é considerado que na presença de uma base, a furanona existe predominantemente como o sal aberto no anel ( $IX$ ).

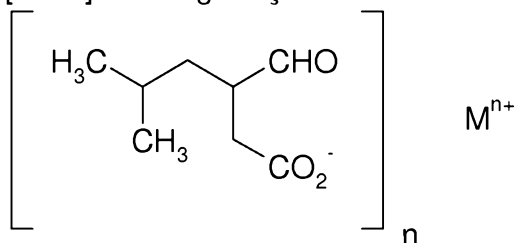




(IX)

[0203] Qualquer base adequada pode ser usada, contanto que não interfira com o processo de hidrogenação, tal como através do envenenamento do catalisador. Exemplos de bases adequadas incluem óxidos, hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos de metal alcalino (tal como Li, Na, K e Rb) e alcalino terroso (tal como Ca e Mg). Outros sais metálicos, tais como sais de zinco, também podem ser usados. Sais de metal alcalino podem ser preferidos, devido a sua solubilidade satisfatória e/ou baixa toxicidade. Bases de amina, tais como amônia, e aminas primárias, secundárias e terciárias podem ser usadas para preparar sais de amônio. Hidróxido de tetra-alquilamônio também pode ser usado, levando à formação de sais de tetra-alquilamônio.

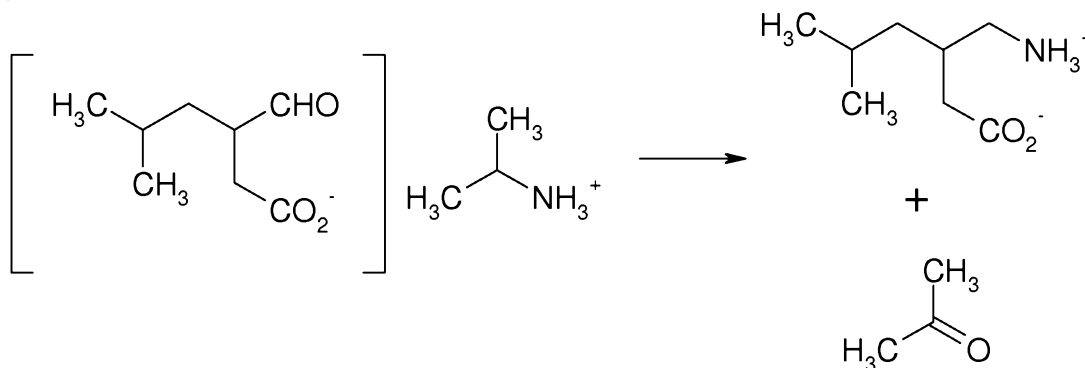
[0204] A hidrogenação do sal da fórmula (IX) fornece um sal da fórmula (X).



(X)

[0205] A di-hidrofuranona (I<sup>A</sup>) é recuperada, depois da reação de hidrogenação, através do tratamento de seu sal com um ácido adequado. Alternativamente, o sal pode ser convertido diretamente em ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II) através do tratamento com uma enzima transaminase ou amina oxidase/imina redutase. Neste caso, pode ser preferível usar o sal de amônio (M<sup>+</sup> = NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou um sal de alquilamônio primário (M<sup>+</sup> = alquila-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), visto que o íon amônio

ou alquilamônio fornece o cossustrato para a enzima. O uso do sal de isopropilamônio em combinação com uma enzima transaminase é um exemplo preferido.

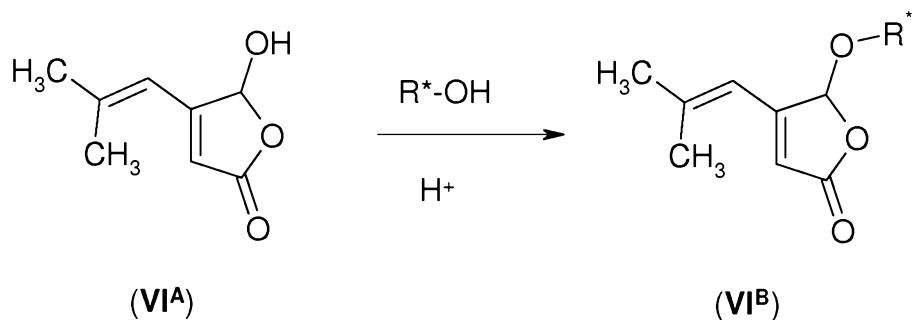


[0206]Furanonas da fórmula (VI), em que R é exceto hidrogênio, também podem ser reduzidas por hidrogenação. Onde R é um grupo alquila, haloalquila, alcoxialquila alquenila, cicloalquila, cicloalquila-alquila, arila ou aril-alquila, estas furanonas podem ser preparadas a partir do composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) através da reação com um álcool R-OH na presença de um catalisador de ácido. Onde R é R<sup>1</sup>-C(O)-, as furanonas podem ser preparadas a partir do composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) através da reação com um anidrido de ácido (R<sup>1</sup>-C(O))<sub>2</sub>O ou cloreto de ácido R<sup>1</sup>-C(O)-Cl, opcionalmente na presença de uma base, por exemplo uma amina terciária. Onde R é R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, as furanonas podem ser preparadas a partir do composto da fórmula (VI<sup>A</sup>) através da reação com um cloreto de sulfonila R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-Cl, opcionalmente na presença de uma base, por exemplo, uma amina terciária.

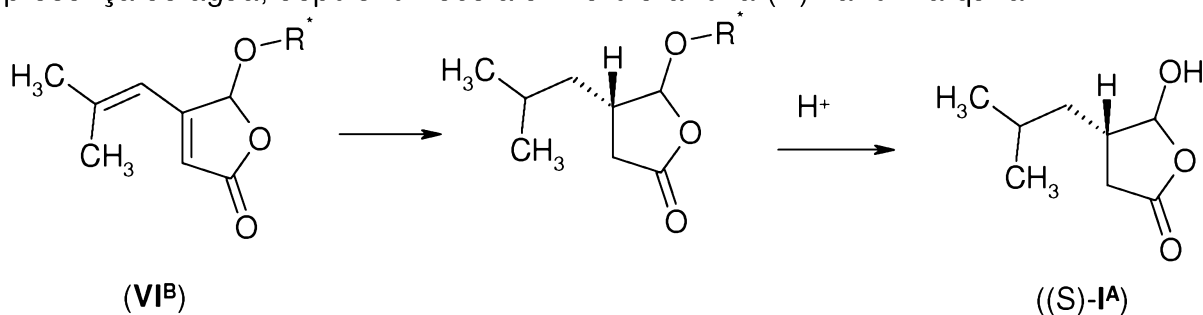
[0207]Após a etapa de hidrogenação, a di-hidrofuranona da fórmula (I<sup>A</sup>) pode ser gerada a partir do produto de redução através do tratamento com ácido (onde R é um grupo alquila, haloalquila, alcoxialquila alquenila, cicloalquila, cicloalquila-alquila, arila ou aril-alquila) ou base (onde R é R<sup>1</sup>-C(O)- ou R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-).

[0208]O uso de um grupo R quiral pode fornecer um produto de hidrogenação quiral sem a necessidade quanto a um catalisador quiral.

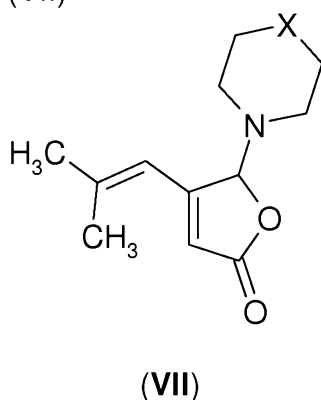
[0209]Por exemplo, a furanona (VI<sup>A</sup>) é reagida com um álcool quiral R\*-OH para fornecer um derivado de éter quiral (VI<sup>B</sup>).



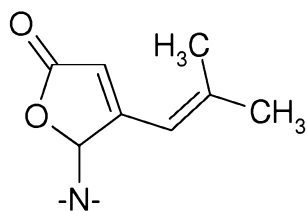
[0210] Álcoois quirais adequados podem incluir álcoois  $\alpha$ -arílicos, tais como 1-feniletanol e 1-naftiletanol, assim como álcoois de terpeno, tais como mentol e borneol. A hidrogenação do derivado (VI<sup>B</sup>) pode proceder em uma maneira enantiosseletiva e o tratamento do produto resultante com um ácido adequado e na presença de água, depois fornece a di-hidrofuranona (I<sup>A</sup>) na forma quiral.



[0211] A furanona (VI<sup>A</sup>) pode ser preparada a partir de um composto da fórmula (VII)

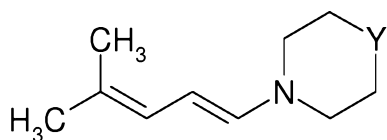


[0212] em que -X- representa uma ligação única, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(álquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(benzil)-, ou



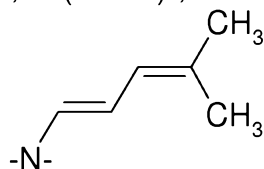
[0213] através do tratamento do composto da fórmula (VII) com água na presença de um catalisador de ácido. Ácidos adequados incluem ácidos minerais, tais como ácido sulfúrico. Alternativamente, o composto da fórmula (VII) pode ser tratado com um álcool R-OH para fornecer diretamente um composto da fórmula (VI), em que R é um grupo alquila, haloalquila, alcoxialquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquila-alquila, arila ou aril-alquila.

[0214] Os compostos da fórmula (VII) podem ser preparados pela reação de uma dienamina da fórmula (VIII).

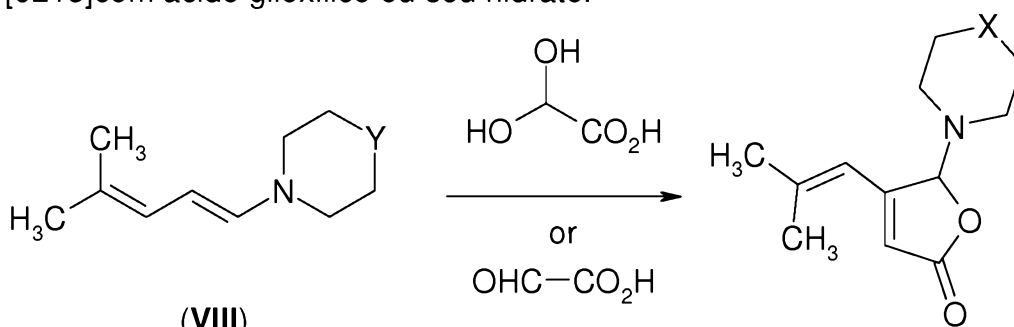


(VIII)

[0215] em que -Y- representa uma ligação única, -CH<sub>2</sub>-, -O-; -NH-, -N(alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(benzil)-, ou

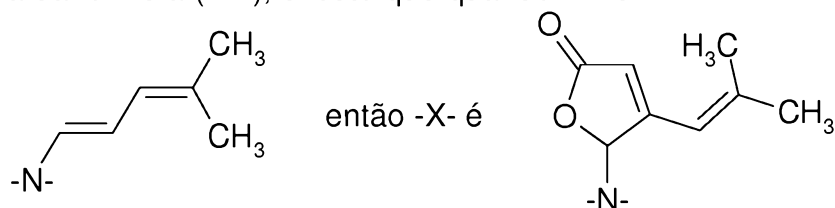


[0216] com ácido glioílico ou seu hidrato.



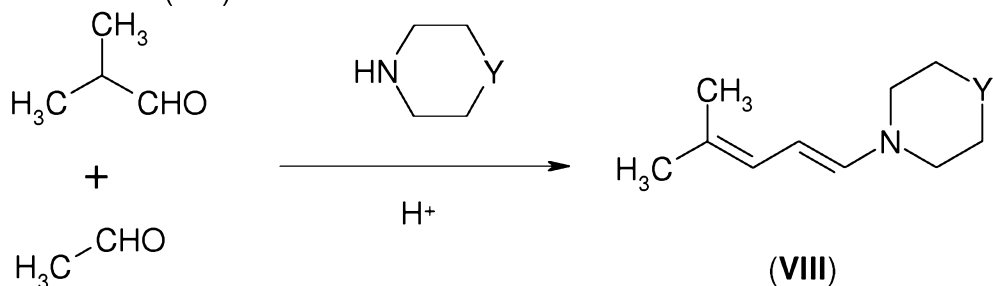
(VII)

[0217]Será entendido que -X- na fórmula (VII) corresponde a -Y- no material de partida da fórmula (VIII), exceto que quando -Y- é



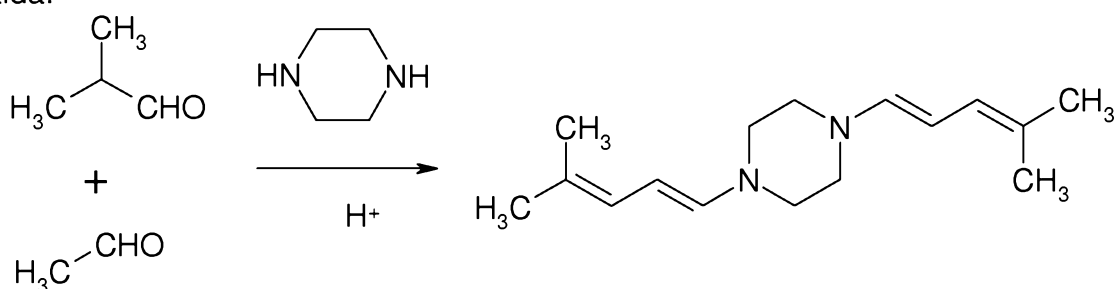
[0218]Os compostos da fórmula (VIII), em que -Y- representa uma ligação única ou  $\text{-CH}_2\text{-}$ , foram preparados pela reação de 4-metil-2-pentenal com pirrolidina ou piperidina (Kienzle, F. *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 1985, 68(5), 1133 - 39). Outros compostos da fórmula (VIII) podem ser analogamente preparados.

[0219]Alternativamente, a condensação de isobutiraldeído e acetaldeído na presença de uma amina adequada, tal como pirrolidina, piperidina ou morfolina, com ácido catalítico em um solvente, tal como acetonitrila, fornece os derivados de dienamina (VIII).



Y = ligação única,  $\text{CH}_2$ , O, N(alquil), N(benzil)

[0220]Se piperazina é usada como a amina, então uma *bis*-dienamina é obtida.

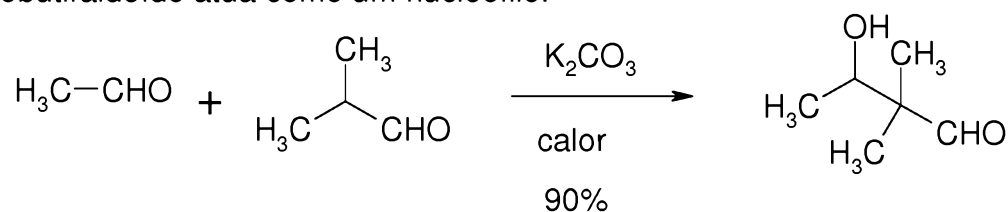


[0221]O composto da fórmula (VIII), em que Y é NH, pode ser obtido através do uso de piperazina mono-protégida como a amina, seguido por uma etapa de

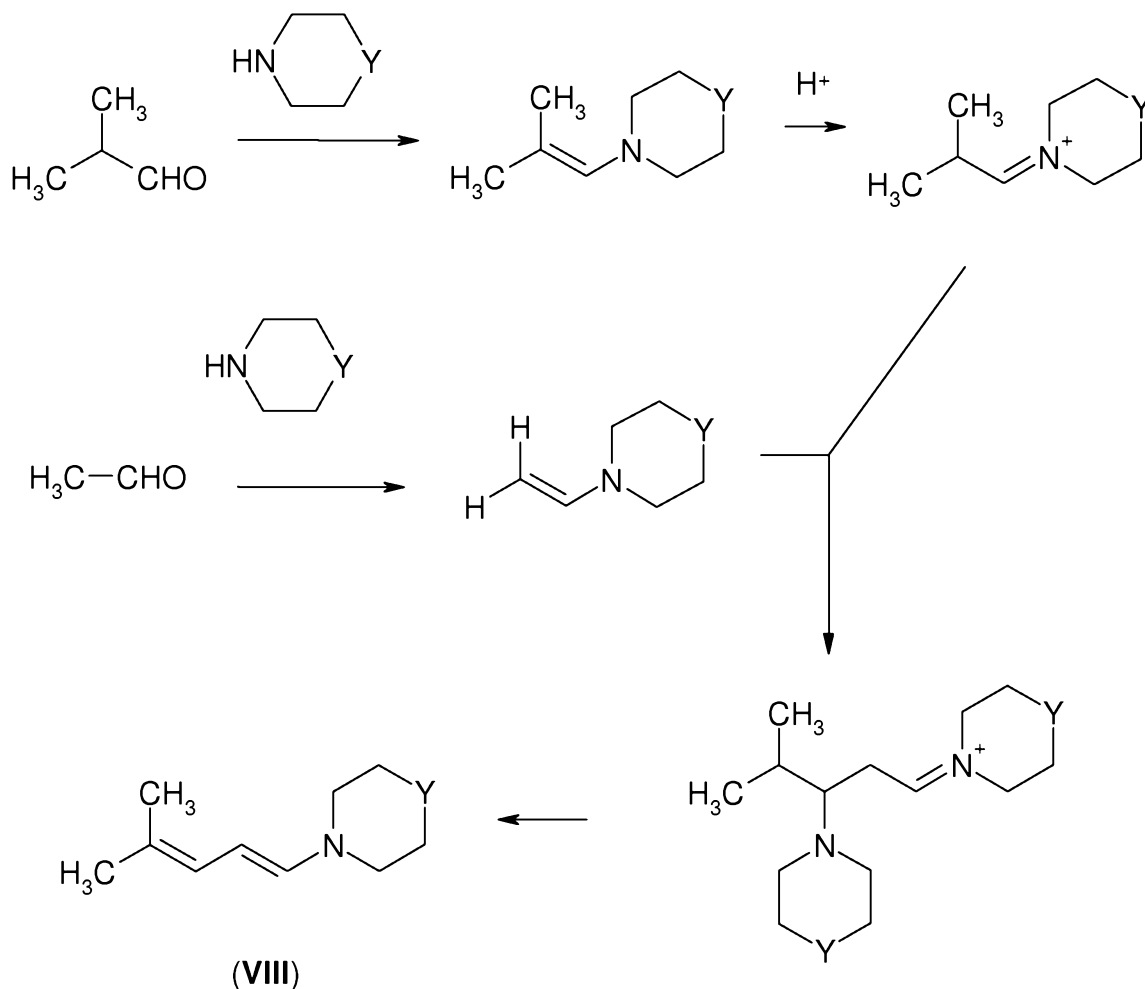
desproteção.

[0222]Aminas secundárias acíclicas, tais como dietilamina e diisopropilamina, também podem ser usadas, mas aminas secundárias cíclicas são preferidas.

[0223]Este modo de reação de isobutiraldeído e acetaldeído difere da reação catalisada por base direta (por exemplo, usando carbonato de potássio como base: patente UK GB834100) que fornece apenas o aduto 2,2-dimetil-3-hidroxibutanal onde isobutiraldeído atua como um nucleófilo.



[0224]Sem limitar a invenção a uma teoria particular, é avaliado que o acetaldeído e o isobutiraldeído são inicialmente convertidos em seus derivados de enamina. Na presença do catalisador de ácido, a isobutiraldeído enamina mais básica é convertida em seu íon imínio. Esta espécie eletrofílica reage preferencialmente com o nucleófilo menos estericamente impedido, que é o acetaldeído enamina - isto garante a reação da forma desejada.



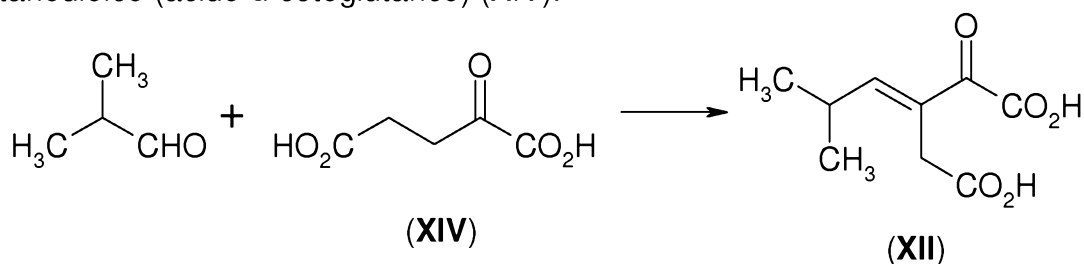
[0225]O método da presente invenção é mais econômico e mais propícios ao aumento em relação aos métodos da literatura de efetuar esta “inversão de polaridade” de reatividade de acetaldeído normal, em que o acetaldeído é convertido em um derivado de enol O-sililado e ligado com o isobutiraldeído sob condições de aldol de Mukiyama. Na presente invenção, os pares de ligação são ativados simultaneamente - efeitos eletrônicos e estéricos direcionando o padrão de reatividade observado. A outra vantagem é que o produto dienamina é a forma “ativado” desejada de 4-metil-2-pentenal para a reação com ácido glioílico para formar as 5-aminofuranonas (VII) desejadas.

[0226]Estes derivados de dienamina da fórmula (VIII) podem ser isolados e purificados, ou, alternativamente, podem ser diretamente tratados com ácido glioílico (ou seu hidrato), que fornece diretamente derivado de furanona (VII).

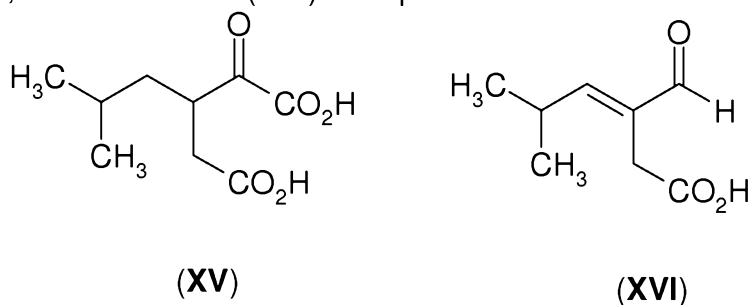
[0227]Os derivados de furanona (VII) podem ser isolados e purificados. O tratamento com ácido aquoso depois fornece furanona (VI<sup>A</sup>).

[0228]De forma global, as transformações apresentadas acima fornecem uma via curta para a fabricação de pregabalina usando materiais de partida baratos e seguros.

[0229]Em uma forma de realização alternativa, a di-hidrofuranona (I) é preparada a partir de ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico (XII), que é facilmente obtido pela condensação de isobutiraldeído com ácido 2-oxopentanodioico (ácido α-cetoglutárico) (XIV).



[0230]A conversão de diácido (XII) em di-hidrofuranona (I) exige uma etapa de decarboxilação e uma etapa de redução. Estas duas etapas de processo podem ser separadamente realizadas, caso este em que a etapa de decarboxilação ou a etapa de redução pode ser a primeira etapa, ou os dois processos podem ser simultaneamente realizados. Quando a etapa de redução é realizada primeiro, o intermediário (XV) será produzido. Quando a etapa de decarboxilação é realizada primeiro, o intermediário (XVI) será produzido.



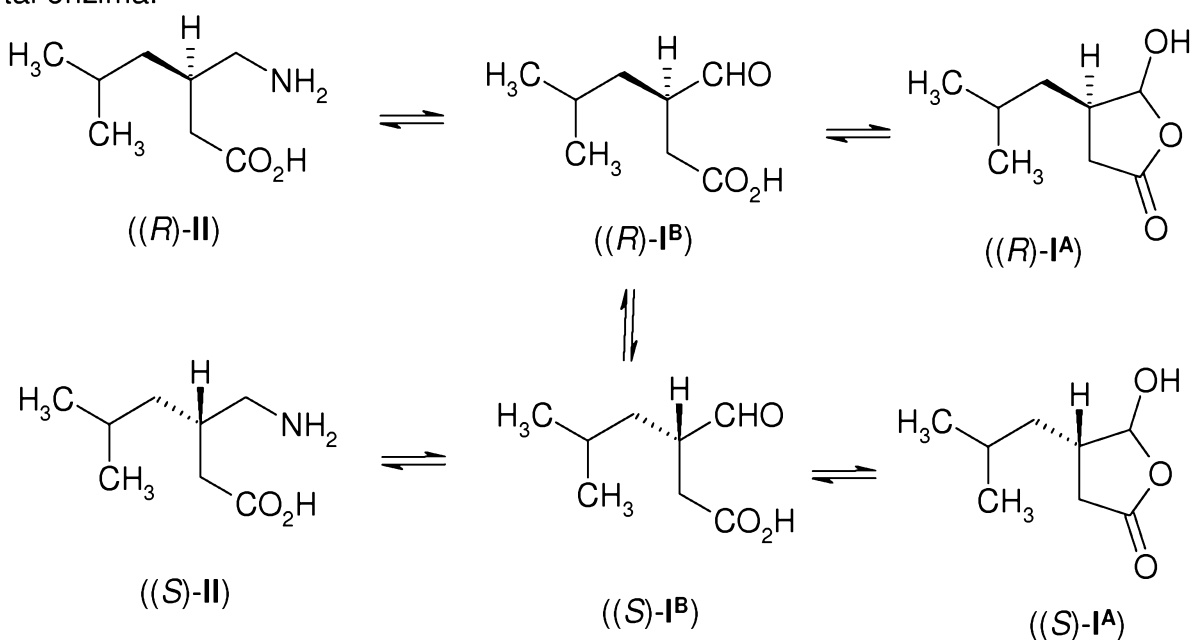
[0231]A etapa de redução pode ser quimicamente realizada, tal como através de hidrogenação, mas, preferivelmente, é obtida usando uma redução mediada por enzima, tal como através de tratamento com uma enzima enoato



redutase. A etapa de decarboxilação é, preferivelmente, realizada através do tratamento do composto com uma enzima decarboxilase.

[0232]Onde as transformações mediadas por enzima são consideradas, a enzima pode ser uma enzima isolada, incluindo uma enzima imobilizada em um portador, pode ser uma preparação de enzima parcialmente isolada, tal como um homogenado celular ou pode ser uma enzima não isolada, caso este em que uma preparação celular total é usada. As células podem incluir aquelas que expressam a enzima naturalmente desejada e as células que foram manipuladas, de modo a expressar a enzima desejada.

[0233]A aminação redutiva mediada por enzima do composto da fórmula (I<sup>A</sup>) é reversível e, assim, o tratamento de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico (II) com uma enzima transaminase ou uma enzima amina oxidase/imina redutase pode levar à formação da di-hidrofuranona (I<sup>A</sup>). O isômero aberto no anel desta é o composto (I<sup>B</sup>), que é epimerizável. Tendo em vista este aspecto, é possível converter ((*R*)-II) em ((*S*)-II) ou aumentar a pureza óptica de uma mistura de ((*R*)-II) e ((*S*)-II) usando tal enzima.



### Exemplos

[0234]A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes, em

que as seguintes abreviações e definições são usadas:

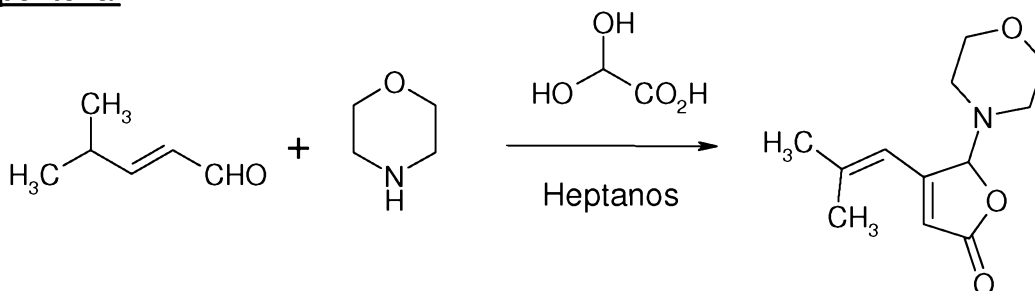
pe	Ponto de ebulição
CPME	éter ciclopentil metílico
d	Dubleto
DIW	água desionizada
dd	Dubleto de dubletos
eq ou eq.	Equivalente
e.e.ou ee	Excesso enantiomérico
ES <sup>+</sup>	ionização por eletrospray em modo positivo
EtOAc	Acetato de Etila
EtOH	Etanol
GC	Cromatografia Gasosa
GC/MS	Cromatografia Gasosa/Espectroscopia de Massas
HOAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
h	Hora
RMN de <sup>1</sup> H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
L	Protônica
LCMS	Litro
m	Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas
mbar	Multiplete
MeOH	Milibar
min	Metanol
mL	Minuto
mmol	Mililitro
mol	Milimol
Mp	Mol
MTBE	Ponto de fusão
NAD <sup>+</sup>	Éter Metil terc-Butílico
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)
PLP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido)
ppm	Fosfato de Piridoxal
pTsOH	Partes por milhão
q	Ácido para-Toluenossulfônico
qNMR	Quarteto
R <sub>f</sub>	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RT	quantitativa
s	Fator de retenção
t	Temperatura ambiente
ThDP	Singleto
TLC	Tripleto
TsOH	Difosfato de tiamina
UPLC	Cromatografia de camada delgada
XRD	Ácido toluenossulfônico (= pTsOH)
δ	Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho
	Cristalografia de difração de raios X
	Substituição química

[0235]Produtos químicos comerciais foram usados, conforme recebidos, a

menos que estabelecido de outro modo. Cromatografia de camada delgada foi realizada em placas de plástico pré-revestidas (sílica 60F254 Merck) e visualizada usando luz UV e imersão em  $\text{KMnO}_4$ . Espectros de RMN de próton ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ) foram registrados em um espectrômetro Varian INOVA 300 MHz. As substituições químicas são cotadas em relação ao tetrametilsilano e referenciadas aos picos de solvente residual, conforme apropriado. A menos que de outro modo indicado, a análise de HPLC quiral foi realizada usando um sistema de HPLC Agilent 1200 e os dados foram processados usando o software Chemstation ou com uma HPLC Varian semiprep/analítica usando software Galaxie.

#### Exemplo 1

Preparação de 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-5H-2-furanona a partir de 4-metil-2-pentenal



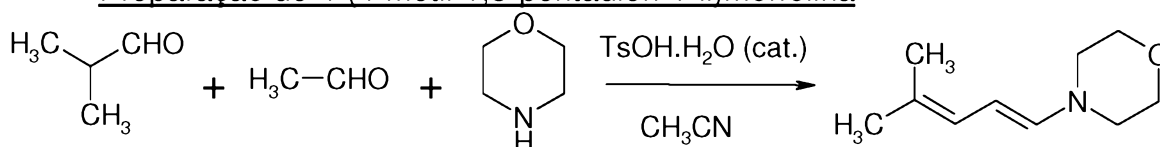
[0236] Uma solução de ácido glioxílico 50 % em água (29,6 g, 0,2 mol) foi adicionada a uma mistura de morfolina agitada bifásica (17,8 g, 0,2 mol) e heptanos (75 mL), que foi pré-esfriada a 0 a 10 °C. A temperatura foi mantida menor do que 10 °C. A mistura foi aquecida a 20 °C e 4-metil-2-pentenal (19,6 g, 0,2 mol) foi adicionado. A mistura foi agitada a 45 °C durante 20 h. Uma grande quantidade de sólido foi formada. Água (100 mL) foi adicionada a temperatura ambiente e a mistura agitada durante 2 h. A mistura foi extraída com éter ciclopentil metílico (100 mL) e a solução orgânica lavada duas vezes com água (100 mL) e concentrada para deixar 30,4 g de produto bruto. Este sólido foi purificado através de recristalização a partir de metanol (100 mL) para fornecer 17,7 g (40 %) de 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-5H-2-furanona pura.

[0237]GC/MS:  $m/z = 223$

[0238]RMN de  $^1\text{H}$ :  $\square$  6,0 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 5,5 (s, 1H), 3,7 (d, 4H), 2,7 (d, 4H), 2,00 (s, 3H), 1,95 (s, 3H).

### Exemplo 2

#### Preparação de 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)morfolina



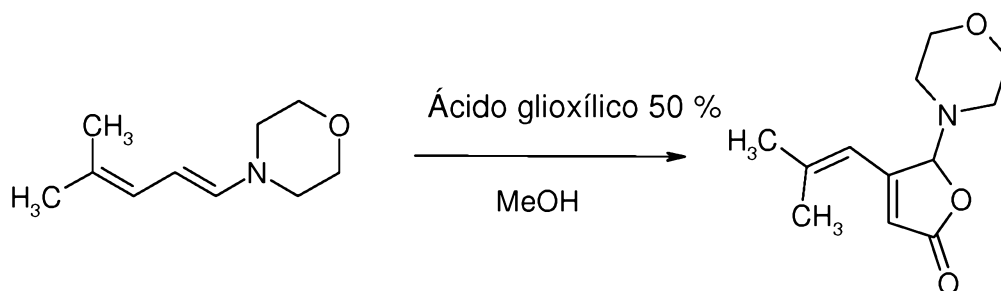
[0239]Isobutiraldeído (46,90 g, 0,65 mol, 1,43 eq.) foi agitado em acetonitrila (300 mL). Morfolina (56,63 g, 0,65 mol, 1,43 eq.) seguido por pTsOH (8,63 g, 0,1 equiv) foram adicionados lentamente na temperatura ambiente à solução de isobutiraldeído. Uma solução de acetaldeído (20 g, 0,454 mol) em acetonitrila (100 mL) foi adicionada às gotas durante 1 h com monitoramento de temperatura interna a 50 °C. Depois da adição completa, a mistura foi agitada durante 30 min a 50 °C e depois esfriada até a temperatura ambiente antes da evaporação do solvente a *vácuo* para fornecer um óleo laranja (123,3 g). O ensaio do produto bruto através de RMN quantitativa usando benzoato de benzila como o padrão interno foi de 40 % que fornece 65 % de rendimento da dienamina desejada.

[0240]GC/MS:  $m/z = 167$

[0241]RMN de  $^1\text{H}$ :  $\square$  6,01 (d, 1H); 5,69 (d, 1H); 5,31 (dd, 1H), 3,70 (m, 4H), 2,89 (m, 4H), 1,71 (s, 3H), 1. 63 (s, 3H).

### Exemplo 3

#### Preparação de 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-5H-2-furanona a partir de 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)morfolina bruta



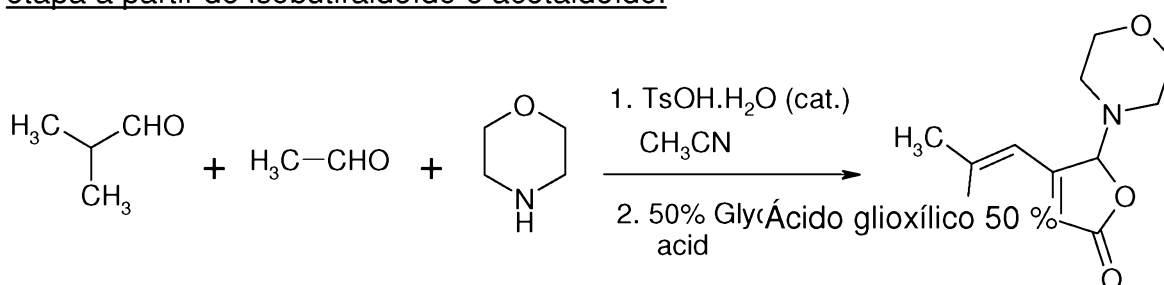
[0242]A dienamina 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)morfolina bruta do exemplo 2 (123,3 g, ensaio 40 %) foi dissolvida em metanol (300 mL) na temperatura ambiente. Em dissolução completa, ácido glicóxico (50 % em peso, 60 g, 1,1 eq) foi adicionado e a mistura agitada bifásica resultante a 50 °C durante 18 h. A mistura de reação foi esfriada até a temperatura ambiente e o solvente removido através de evaporação rotatória. O resíduo foi particionado entre acetato de etila (200 mL) e solução de carbonato de sódio saturada (200 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (100 mL), e os orgânicos combinados lavados com salmoura e evaporados em um óleo espesso que solidificou em repouso (89,0 g, ensaio 67 % através de RMNq, 60 % de rendimento).

[0243]GC/MS:  $m/z = 223$

[0244]RMN: como exemplo 1.

#### Exemplo 4

Preparação de 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-5H-2-furanona em única etapa a partir de isobutiraldeído e acetaldeído.

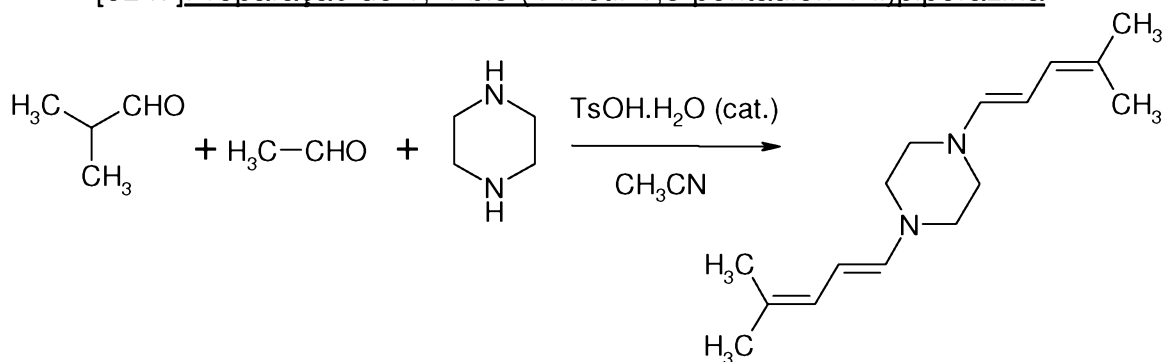


[0245]Isobutiraldeído (102,90 g, 1,43 mol) foi agitado em acetonitrila (600 mL). Morfolina (124,3 g, 1,43 mol) seguido por pTsOH (19,0 g, 0,1 equiv) foram lentamente adicionados na temperatura ambiente à solução de isobutiraldeído. Uma

solução de acetaldeído (44,05 g, 1,0 mol) em acetonitrila (150 mL) foi adicionada às gotas durante 1 h com monitoramento de temperatura interna a 50 °C. Depois que a adição foi concluída, a mistura foi agitada durante 30 min a 50 °C e depois esfriada a <10 °C. Ácido glioxílico (50% em peso, 211,3 g, 1,43 mol) foi adicionado e a mistura bifásica resultante agitada a 50 °C durante 18 h. A mistura de reação foi esfriada até a temperatura ambiente e o solvente removido através de evaporação rotatória. O resíduo foi particionado entre acetato de etila (1 L) e solução de carbonato de sódio saturada (1 L). O aquoso foi extraído com acetato de etila e os orgânicos combinados lavados com salmoura e evaporados a um óleo espesso que solidificou em repouso (166 g). O produto bruto foi triturado com MTBE na temperatura ambiente. O produto foi coletado por filtração e lavado com MTBE para fornecer 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-5*H*-2-furanona pura (84 g, 37 % de rendimento) idêntica ao material preparado no exemplo 1. A análise do sólido bruto (166 g) indicou aproximadamente 50 % de rendimento.

[0246]Exemplo 5

[0247]Preparação de 1, 4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)piperazina



[0248]Uma solução de piperazina (43,0 g, 0,5 mol) e ácido 4-toluenossulfônico mono-hidratado (4,4 g, 0,023 mol) em acetonitrila (600 mL) foi preparada. Esta solução foi aquecida a 50 °C e isobutiraldeído (100 mL, 1,10 mol) adicionado durante 10 minutos. A solução se tornou alaranjada e um precipitado branco transitório ocorreu. Uma solução de acetaldeído (30,8 g, 0,70 mol) em acetonitrila (30 mL), depois foi adicionada via bomba de seringa durante 3 h a 50 °C.

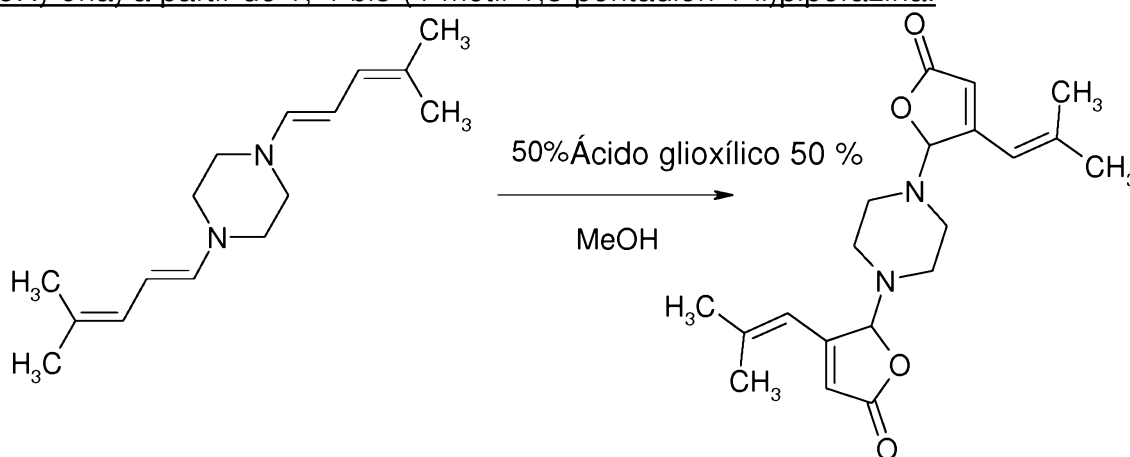
Uma suspensão foi formada que foi agitada a 50 °C durante 0,5 h. O solvente foi removido e o sólido residual isolado a partir de metanol (500 mL) a -5 °C. Este foi filtrado e lavado com metanol esfriado e seco para fornecer 52,9 g (60 %) de 1,4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)piperazina.

[0249]GC/MS: m/z = 246.

[0250]RMN de  $^1\text{H}$ :  $\square$  6,00 (d, 2H); 5,70 (d, 2H); 5,28 (dd, 2H); 2,92 (s, 8H); 1,73 (s, 6H); 1,68 (s, 6H). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 140,6 (C), 126,3 (CH), 123,4 (CH), 100,2 (CH), 48,2 ( $\text{CH}_2$ ), 25,8 ( $\text{CH}_3$ ), 18,1 ( $\text{CH}_3$ ).

### Exemplo 6

Preparação de 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) a partir de 1, 4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)piperazina.



[0251]1,4-bis-(4-Metil-1,3-pentadien-1-il)piperazina (37,3 g, 0,151 mol; veja o Exemplo 5) foi carregada ao metanol (300 mL). A temperatura foi ajustada a 34 °C e uma solução de ácido glioxílico 50 % em água (44,9 g, 0,302 mol) foi adicionada rapidamente (durante 5 minutos). A suspensão resultante foi agitada a 45 °C durante 15 h; esfriada a 0 a 10 °C durante 2 h e filtrada. O sólido foi lavado com metanol (100 mL) e seco para fornecer 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) pura (32,3 g, 60 %). Um extra de 5 % pode ser obtido a partir do líquido precursor através de concentração.

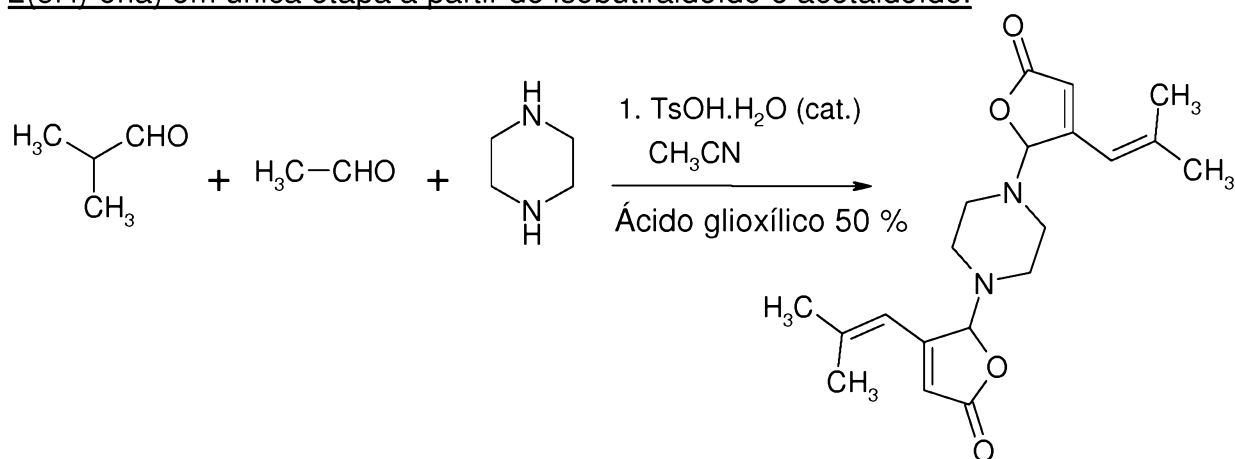
[0252]RMN de  $^1\text{H}$ :  $\square$  5,96 (d, 2H), 5,87 (d, 2H), 5,56 (m, 2H), 2,71 (s, 8H),

2,07 - 1,90 (m,12H). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 172,3 (C), 159,2 (C), 150,9 (C), 116,6 (CH), 115,4 (CH), 99,2 (CH), 46,7 ( $\text{CH}_2$ ), 28,2 ( $\text{CH}_3$ ), 21,4 ( $\text{CH}_3$ ).

[0253]Esta reação também pode ser conduzida em isopropanol, acetonitrila-água, tolueno-água ou em heptano-água com rendimentos similares.

#### Exemplo 7

Preparação de 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) em única etapa a partir de isobutiraldeído e acetaldeído.



[0254]Ácido tósico (6,5 g, 0,03 mol) foi carregado a uma solução de piperazina (59 g, 0,69 mol) em acetonitrila (240 mL). A reação foi aquecida a 50 °C e agitada até que a dissolução dos sólidos foi observada, antes da adição de isobutiraldeído (138 mL, 1,51 mol). A reação foi mantida a 50 °C antes de um carregamento de solução de acetaldeído (60 mL;1,07 mol) em acetonitrila (30 mL) ao vaso durante 3 h via bomba de seringa. Na conclusão da adição, a reação foi agitada durante um adicional de 30 minutos antes de uma solução de ácido glioilico em água 50 % p/p (148 g, 1,0 mol) ser adicionada durante 5 min à mistura de reação, seguido por água (50 ml). A reação depois foi aquecida a 70 °C durante 2 h, depois a 50 °C durante a noite. A reação depois foi esfriada a 5 °C e mantida durante 30 minutos. 5,5'-(Piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) precipitou e foi isolada por filtração e lavada com acetonitrila (2 x 100 mL) para



fornecer o produto desejado (126 g, ensaio 93,5 %, 66 % de rendimento a partir de acetaldeído).

#### Exemplo 8

#### Preparação livre de solvente de 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona)

[0255]Isobutiraldeído (79 g, 100 mL, 1,1 mol) foi carregado a um frasco de fundo Redondo de 3 pescoços e argônio foi fluxado através do sistema. Piperazina (43 g, 0,5 mol) e TsOH-H<sub>2</sub>O (4,4 g; 0,023 mol) foram divididos em 4 porções iguais contendo piperazina (10,75 g) e TsOH-H<sub>2</sub>O (1,1 g). A adição da primeira porção de piperazina (10,75 g) resultou em reação exotérmica a partir de 24 °C a 35 °C. Este foi seguido pela primeira porção de TsOH (1,1 g). A reação foi agitada até que toda a piperazina foi dissolvida (t = 35 °C), depois de que a segunda porção de piperazina (10,75 g) ser adicionada, seguido por TsOH (1,1 g) (t = 41 °C). A agitação foi continuada até que toda a piperazina foi dissolvida (t = 41 °C), depois a terceira porção de piperazina (10,75 g) foi adicionada, seguido por TsOH (1,1 g). Depois da 3<sup>a</sup> carga, uma solução clara foi gerada e depois a quarta porção de piperazina (10,75 g) & TsOH-H<sub>2</sub>O foram adicionados, seguido por TsOH (1,1 g) (t = 52 °C). Na conclusão da adição, a reação foi agitada a 50 °C durante 30 min.

[0256]Outro frasco (50 mL) foi carregado com acetaldeído (30,8 g, 39 mL, 0,7 mol) e colocado em um banho de água gelada (0 a 2 °C). O frasco de acetaldeído foi conectado ao frasco de 3 pescoços através de cânula por intermédio de um septo. Uma corrente de argônio depois foi passada através do frasco de acetaldeído na taxa que garante que a adição do acetaldeído foi concluída dentro de 3 h. Depois que todo o acetaldeído foi adicionado, a reação foi agitada durante 30 min a 50 °C, depois esfriada a 40 °C e ácido glioxílico 50 % (104 g, 78 mL) foi adicionado às gotas durante 45 min a uma taxa para manter a temperatura abaixo de 50 °C. Água (100 mL) depois foi adicionada e a reação foi aquecida a 70 °C

durante 5 h. A reação foi esfriada a 4 °C em um banho de água gelada. O produto precipitado foi filtrado e a torta do filtro foi lavada com água fria (100 mL). Depois da secagem a vácuo a 50 °C 88,9 g (71 %) o produto desejado foi obtido. O precipitado contém 78,5 % do composto do título (ensaio de HPLC).

#### Exemplo 9

#### Preparação alternativa de 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) com adição simultâneo dos dois aldeídos

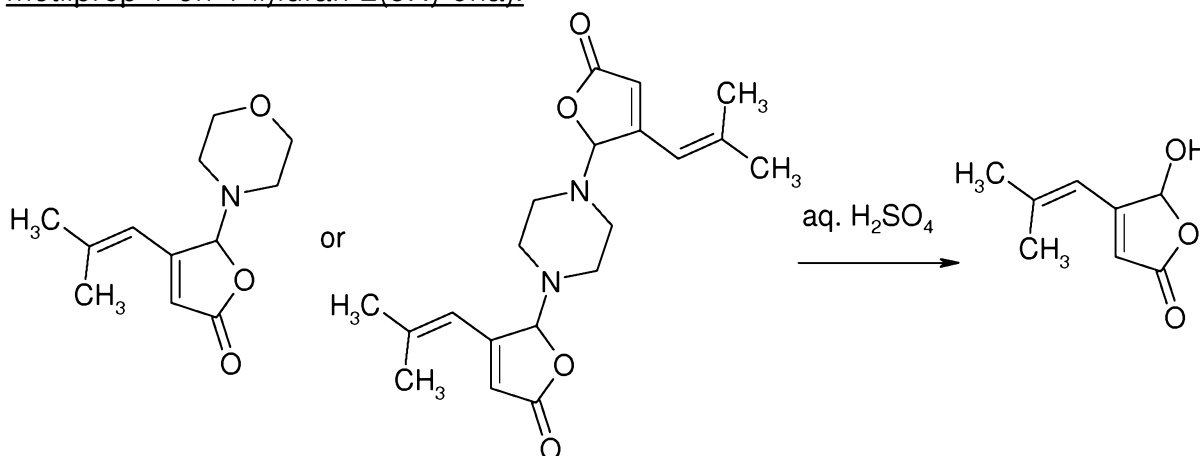
[0257]Piperazina (236,6 g) foi carregada a um vaso seco de 3 L limpo ajustado com termômetro, funil de adição (100 mL) e condensador de refluxo. pTsOH (25,3 g) foi carregado ao vaso seguido por acetonitrila (550 mL). O agitador foi iniciado e o vaso foi inertizado com nitrogênio. Isobutiraldeído (150 mL, 27 % da carga total) foi carregada à pasta fluida de piperazina/pTsOH agitada e uma elevação de temperatura a aproximadamente 43 °C foi observada. A suspensão branca depois foi aquecida a 50 °C (+/- 5 °C). Uma solução de isobutiraldeído esfriada pré-misturada (400 mL, 73 % de carga total) e acetaldeído esfriado (260 mL) foram carregados a um vaso seco de 1 L limpo e esta mistura foi mantida em um banho de gelo. A mistura de isobutiraldeído/acetaldeído foi carregada aos conteúdos do vaso de 3 L em alíquotas de 100 mL entre 5 a 6 h a 50 °C. Os conteúdos de um frasco de reação foram modificados a partir de uma suspensão branca a uma solução borronha e finalmente uma suspensão laranja durante a adição do acetaldeído. Depois da conclusão da adição, a suspensão foi agitada a 50 °C durante aproximadamente 0,5 a 1,0 h.

[0258]Solução de ácido glioxílico aquoso (50 % p/p) foi carregada à suspensão entre 10 a 15 min e a temperatura aumentou para aproximadamente 75 °C. 5,5'-(Piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) foi observada cristalizar a partir da solução. A suspensão foi agitada a 70 °C (+/- 5 °C) durante 6 h, depois esfriada com agitação na temperatura ambiente. A batelada

depois foi esfriada entre -5 a 0 °C e mantida entre 3 a 4 h antes de a suspensão ser filtrada e a torta lavada com metanol esfriado (1 x 500 mL) depois 2 x 500 mL de metanol na temperatura ambiente. O produto lavado foi seco em um forno a vácuo entre 40 a 50 °C em peso constante para fornecer 474 g de 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona) pura 98 % (70 %).

### Exemplo 10

Preparação de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona a partir de 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-2(5*H*)-furanona ou 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona).



[0259] Uma solução de ácido sulfúrico aquosa 10 % p/p (110 g) foi carregada em 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-2(5*H*)-furanona (20,0 g, 0,896 mol) e a mistura foi agitada em refluxo durante 4 h ou até que TLC (CPME:HOAc 100:3) indicou a conclusão da reação. A mistura permaneceu uma suspensão durante todo o tempo. Esta depois foi esfriada a 5 °C, mantida durante 2 h, e filtrada. O sólido branco foi lavado com água e seco para fornecer 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona (12,9 g, 93 %).

[0260] Alternativamente, uma solução de ácido sulfúrico aquosa 10 % p/p (412 g) foi carregada em um vaso contendo 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona) (60 g, 0,167 mol). Os conteúdos foram agitados e depois aquecidos em refluxo. A reação foi mantida em refluxo até que o material

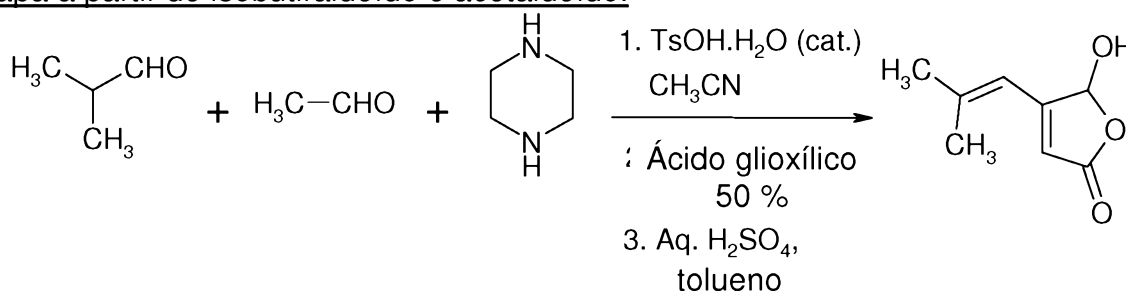
de partida foi consumido, que foi determinado através de dissolução. Na conclusão da reação, a batelada foi esfriada a 35 °C ponto no qual o composto alvo começou a cristalizar. A pasta fluida foi ainda esfriada entre 0 a 5 °C e depois transferida para um filtro. O produto foi filtrado, lavado com água (2 x 100 mL) e depois seco sob vácuo a <50 °C, para fornecer 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona (42,0g, 81 %).

[0261]GC/MS: m/z = 154

[0262]RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6,10 (s, 1H); 5,92 (s, 1H); 5,88 (s, 1H); 5,35 (bs, 1H, O-H); 1,98 (s, 3H); 1,93 (s, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 172,8 (C), 161,4 (C), 152,3 (C), 115,3 (CH), 114,9 (CH), 99,5 (CH), 28,2 ( $\text{CH}_3$ ), 21,4 ( $\text{CH}_3$ ).

### Exemplo 11

Preparação de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona em única etapa a partir de isobutiraldeído e acetaldeído.

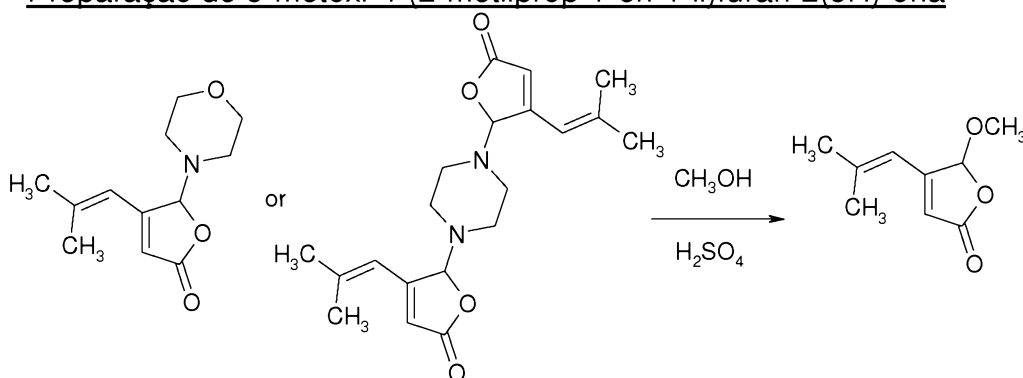


[0263]Uma mistura de piperazina (43,0 g, 0,5 mol) e isobutiraldeído (200 mL) foi submetida ao refluxo sob Dean-Stark até que a quantidade teórica de água (18 mL) foi coletada. O excesso de isobutiraldeído foi destilado para deixar uma massa cristalina de 1,4 bis(2-metilpropen-1-il)piperazina. Este foi dissolvido em acetonitrila (1,2 L) e isobutiraldeído extra (100 mL, 1,0 mol) foi adicionado. Piperazina extra (4,4 g) foi adicionada seguido por ácido p-toluenossulfônico (4,4 g, 23,2 mmol). A temperatura foi ajustada a 40 °C e uma solução de acetaldeído (44 g, 1,0 mol) em acetonitrila (40 mL) foi adicionada durante 4 h. A mistura de reação foi agitada a 40 °C durante 1 h e na temperatura ambiente durante 4 h. A acetonitrila foi destilada e o resíduo colocado em suspensão em tolueno (400 mL). Uma mistura de ácido

gloxílico 50 % (148 g) e água (150 mL) foi adicionada durante 0,5 h. A mistura depois foi agitada a 45 °C durante 15 h. Ocorreu um sólido precipitado. Ácido sulfúrico diluído (10 %, 1 L) foi adicionado e a mistura submetida ao refluxo durante 3 h. Uma mistura bifásica resultou. A fase de tolueno foi separada. Este continha aproximadamente 50 % de rendimento (com base em acetaldeído) de 5-hidróxi-4-(2-metilpropen-1-il)-2-furanona através da análise.

### Exemplo 12

#### Preparação de 5-metóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona



[0264]4-(2-Metil-1-propenil)-5-morfolino-2(5H)-furanona (7,70 g, 34,5 mmols) foi agitada em MeOH (50 mL) com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 mL, 2,2 eq.) em refluxo durante 3 h até o desaparecimento do material de partida através de GC. A mistura de reação foi esfriada até a temperatura ambiente. O solvente depois foi evaporado *a vácuo* e o resíduo foi diluído com EtOAc (50 mL). A fase orgânica foi lavada com H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL). O solvente depois foi evaporado *a vácuo* para fornecer 5-metóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona como um óleo laranja (5,50 g, 95 %) que pode ser usado sem purificação.

[0265]Alternativamente, 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) (130 g, 363 mmols) e MeOH (690 mL) foram carregados em frasco de fundo redondo de 2 L com agitação mecânica para formar uma suspensão. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (43 mL, 762 mmols) foi adicionado às gotas com agitação entre 20 a 25 °C. Uma leve reação exotérmica foi observada, e a natureza dos sólidos presentes mudou a partir de dispersa e facilmente misturada para uma pasta fluida

mais espessa. A mistura de reação foi submetida ao refluxo durante 5 h. Depois de 0,5 h, a conclusão da dissolução (líquido laranja) foi observada. Depois de 5 h, LCMS mostrou ~99 % do produto desejado. A mistura foi esfriada na temperatura ambiente e deixada para cristalização de sulfato de piperazina. Os sedimentos foram filtrados, e a torta do filtro foi lavada com MeOH esfriado em gelo (400 mL). O filtrado foi concentrado *a vácuo* (temperatura do banho 40 °C), e o resíduo foi particionado entre água (50 mL) e MTBE (300 mL). A camada de água foi separada e extraída adicionalmente (2 x 300mL de MTBE). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com. NaHCO<sub>3</sub> aq saturado (200 mL). A camada de MTBE foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com agitação durante 1,5 h, filtrada e evaporada para fornecer 5-metóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona como um óleo laranja (120g, 98 %).

[0266]Destilada a vácuo 0,2 a 0,3 mbar com pe. entre 100 a 105 °C. GC/MS: m/z = 168; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,59 (1H, s) 5,88 - 5,86 (1H, m) 5,75 (1H, d, J = 0,6) 3,53 (3H, s) 2,01 - 2,00 (3H, m) 1,97 - 1,96 (3H, m). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 171,4 (C), 159,2 (C), 151,9 (C), 115,8 (CH), 115,2 (CH), 104,4 (CH), 56,1 (CH<sub>3</sub>), 28,2 (CH<sub>3</sub>), 21,4 (CH<sub>3</sub>).

[0267]Os seguintes compostos foram preparados a partir de 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolino-2(5H)-furanona de acordo com o primeiro entre os métodos acima através de substituição de metanol por 3-metilbutanol (álcool isoamílico), *n*-pentanol (álcool amílico) ou *n*-butanol:

#### Exemplo 12A

##### 5-(3-Metilbutóxi)-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona

[0268]Destilada a vácuo 0,4 mbar com pe. entre 139 a 140 °C; GC/MS: m/z = 224; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,94 (1H, s) 5,87 - 5,84 (1H, m) 5,80 (1H, s) 3,86 - 3,80 (1H, m) 3,70 - 3,64 (1H, m) 2,00 (3H, s) 1,96 (3H, s) 1,77 - 1,66 (1H, m) 1,57 - 1,50 (2H, m) 0,93 - 0,91 (3H, m) 0,91 - 0,89 (3H, m)

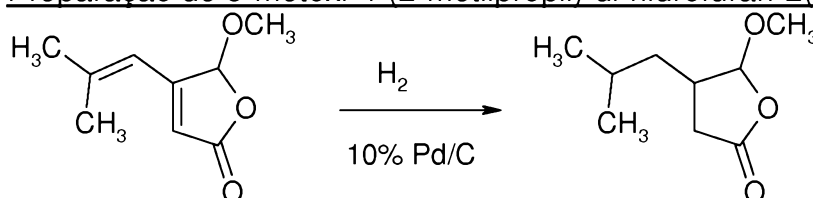
#### Exemplo 12B

4-(2-Metilprop-1-en-1-il)-5-pentiloxifuran-2(5H)-ona

[0269]Destilada a vácuo 0,08 mbar com pe. de entre 123 a 134 °C; GC/MS:  $m/z = 224$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,94 (s, 1H); 5,86 (s, 1H); 5,80 (s, 1H); 3,84 - 3,75 (m, 1H); 3,68 - 3,59 (m, 1H); 2,01 (s, 3H); 1,95 (s, 3H); 1,69 - 1,59 (m, 2H); 1,38 - 1,29 (m, 4H); 0,95 - 0,85 (m, 3H)

Exemplo 12C5-Butóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona

[0270]Destilada a vácuo 0,05 mbar com pe. de entre 136 a 146 °C; GC/MS:  $m/z = 210$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,94 (s, 1H); 5,86 (s, 1H); 5,80 (s, 1H); 3,85 - 3,76 (m, 1H); 3,69 - 3,60 (m, 1H); 2,00 (s, 3H); 1,95 (s, 3H); 1,68 - 1,58 (m, 2H); 1,45 - 1,32 (m, 2H); 0,93 (t, 3H,  $J=7,4$  Hz)

Exemplo 13Preparação de 5-metóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona

[0271]Uma solução de 5-metóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona (100 g, veja o exemplo 12) em MTBE (700 mL), 5 g (5 % em peso) de Pd/C 10 % foi carregada em um vaso de hidrogenação. 1 atm de gás hidrogênio foi introduzido e a pressão foi mantida constante durante a reação. Depois de 7 h a 20 °C, a reação foi filtrada através de uma almofada de celite ( $\phi 60$  mm,  $H = 30$  mm) e enxaguada com MTBE (3 x 50 mL). O filtrado foi lavado com solução de  $\text{NaHCO}_3$  1 M (200 mL), água, salmoura e seco em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Depois da remoção do solvente, 5-metóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona foi obtida como líquido incolor (98 g, 96 %).

[0272]GC/MS:  $m/z = 172$

[0273]RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,25 (d,  $J = 5,0$  Hz, 0,53 H, isômero principal), 5,04 (d,  $J = 2,4$  Hz, 0,26H, isômero secundário), 3,48 (s, 0,92H, isômero

secundário), 3,46 (s, 1,66H, isômero principal), 2,78 (dd,  $J = 17,7, 8,6$  Hz, 0,33H), 2,59 - 2,42 (m, 1,27H, isômero principal), 2,42 - 2,34 (m, 0,33H, isômero secundário), 2,29 (dd,  $J = 16,7, 11,8$  Hz, 0,63H, isômero principal), 2,15 (dd,  $J = 17,7, 4,6$  Hz, 0,33H, isômero secundário), 1,67 - 1,31 (m, 2,63H ambos os isômeros), 1,28 - 1,19 (m, 0,33H, isômero secundário), 0,95 - 0,86 (m, 6H ambos os isômeros). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 177,7 (C, isômero principal), 176,04 (C, isômero secundário), 110,1 (CH, isômero secundário), 106,1 (CH, isômero principal), 57,0 ( $\text{CH}_3$ , isômero secundário), 56,6 ( $\text{CH}_3$ , isômero principal), 41,2 ( $\text{CH}_2$ , isômero secundário), 39,1 ( $\text{CH}_2$ , isômero secundário), 38,3 ( $\text{CH}_2$ , isômero principal), 37,1 ( $\text{CH}_2$ , isômero principal), 33,9 (CH, isômero secundário), 32,8 (CH, isômero principal), 26,0 (CH, isômero principal), 25,8 (CH, isômero secundário), 23,0 ( $\text{CH}_3$ , isômero principal), 22,9 (isômero secundário), 22,7 (isômero principal), 22,6 (isômero secundário).

[0274]Usando o mesmo método geral e partindo dos compostos dos exemplos 12A, 12B e 12C respectivamente, os seguintes compostos também foram obtidos:

#### Exemplo 13A

##### 5-(3-Metilbutóxi)-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona

[0275]GC/MS:  $m/z = 228$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (0,86H, d,  $J = 5,0$  Hz) 5,13 (0,14H, d,  $J = 2,7$  Hz) 3,87 - 3,79 (m, 1H) 3,57 - 3,45 (m, 1H) 2,58 - 2,37 (2H, m) 2,35 - 2,27 (0,79H, m) 2,20 - 2,11 (0,21H, m) 1,74 - 1,62 (1H, m) 1,61 - 1,44 (4H, m) 1,42 - 1,31 (1H, m) 0,95 - 0,86 (12H, m)

#### Exemplo 13B

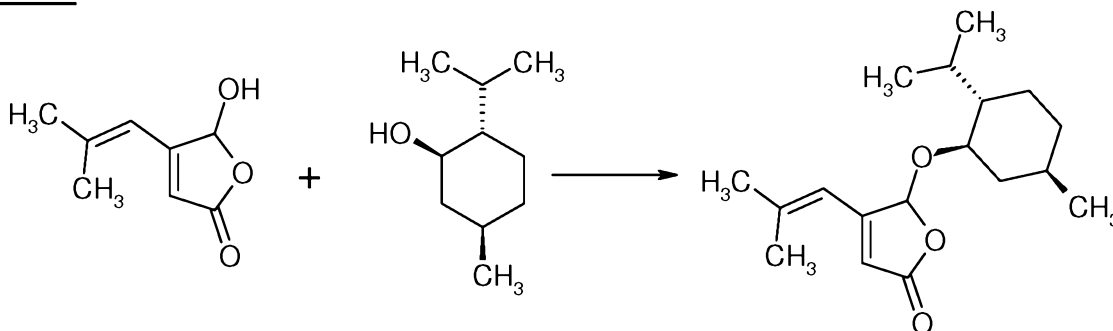
##### 4-(2-Metilpropil)-5-pentiloxidi-hidrofuran-2(3H)-ona

[0276]GC/MS:  $m/z = 228$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (0,77H, d,  $J = 5,0$  Hz) 5,13 (0,23H, d,  $J = 2,6$  Hz,) 3,83 - 3,75 (1H, m) 3,55 - 3,40 (1H, m) 2,59 - 2,37 (2H, m) 2,32 (0,73H, dd,  $J = 16,6, 11,8$  Hz) 2,15 (0,27H, dd,  $J = 17,7, 5,0$  Hz) 1,67 - 1,45 (4H, m) 1,41 - 1,25 (5H, m) 0,96 - 0,86 (9H, m)



Exemplo 13C5-Butóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona

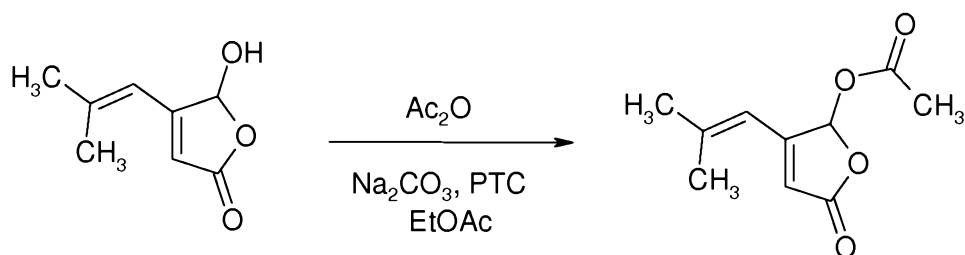
[0277]GC/MS:  $m/z = 214$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (0,8H, d,  $J = 5,0$  Hz) 5,13 (0,2H, d,  $J = 2,6$  Hz,) 3,85 - 3,75 (1H, m) 3,56 - 3,41 (1H, m) 2,59 - 2,38 (2H, m) 2,31 (0,76H, dd,  $J = 16,5, 11,7$  Hz) 2,15 (0,24H, dd,  $J = 17,6, 5,0$  Hz) 1,66 - 1,45 (4H, m) 1,43 - 1,30 (3H, m) 0,95 - 0,87 (9H, m)

Exemplo 14Preparação e hidrogenação de 5-(L-Mentilóxi)-4-(2-metil-1-propenil)-2(5H)-furanona

[0278]Uma mistura de 5-hidróxi-4-(2-metil-1-propenil)-2-furanona (59,5 g, 0,386 mol), L-mentol (89,5 g, 1,5 equivalente) e ácido metanossulfônico (1,5 g) foi agitada a 70 a 80 °C sob vácuo (para remover água) durante 100 h. A massa líquida foi vertida (quente) em acetonitrila (450 mL) e o composto do título isolado através de esfriamento, filtração e lavagem. O rendimento foi 76,2 g (67 %). Cristais adequados para XRD foram cultivados através de evaporação lenta de uma solução de acetona. A configuração no acetal carbono foi (*R*).

[0279]A hidrogenação de 5-(L-mentilóxi)-4-(2-metil-1-propenil)-2-furanona em acetato de etila usando as condições do Exemplo 13, forneceu o derivado saturado em rendimento quantitativo. Através de RMN de  $^1\text{H}$ , o composto foi uma mistura de diastereômeros 1:1.

Exemplo 15Preparação de 5-acetóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona

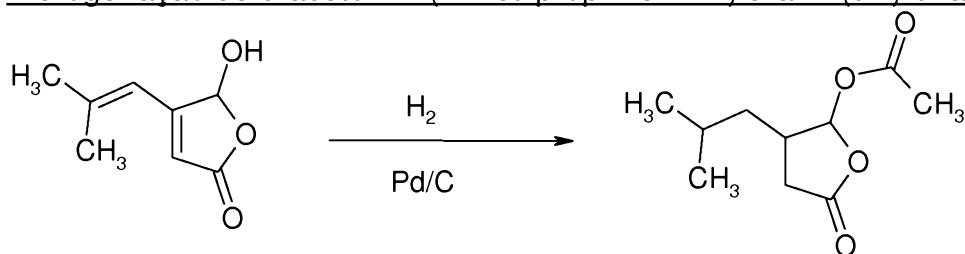


[0280] Uma suspensão de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona (19 g, 0,123 mol) em acetato de etila (100 mL) foi tratada com carbonato de sódio sólido (13,1 g, 0,123 mol) e hidrogenossulfato de tetrabutilamônio (0,5 g). Anidrido acético (18,8 g, 1,5 eq.) foi adicionado em uma porção. Uma reação suavemente exotérmica ocorreu. A mistura foi agitada durante a noite, água (100 mL) foi adicionada e a fase orgânica separada (o pH da fase aquosa foi 6,0). A fase de acetato de etila foi lavada em água e concentrada para deixar um sólido (24,6 g, 100 %). Isto foi purificado através de TLC (CPME:ácido acético 100:3). Se esta reação é realizada em acetato de isopropila, o composto puro pode ser isolado através de esfriamento da solução de acetato de isopropila depois da lavagem com água em cerca de 70 % de rendimento.

[0281] m/z: 196

#### Exemplo 16

##### Hidrogenação de 5-acetóxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5*H*)-ona

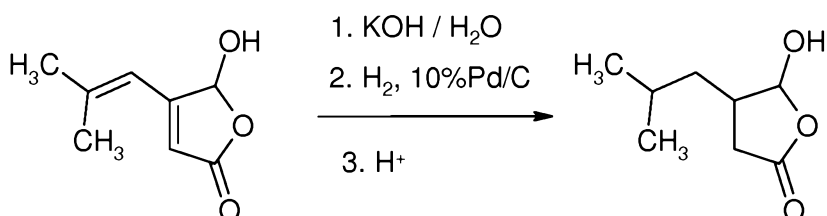


[0282] O material do Exemplo 34 foi hidrogenado sob condições similares às aquelas esboçadas no Exemplo 13 para fornecer um rendimento >90 % de 5-acetóxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-2(5*H*)-furanona como uma mistura de diastereômeros 1:1. O produto é acompanhado por aproximadamente 5 % de 4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidrofuran-2(5*H*)-ona. O produto pode ser hidrolisado como no

exemplo 30 para fornecer rendimentos de ácido 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5*H*-2-furanona/3-formil-5-metil-hexanoico.

#### Exemplo 17

Preparação de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)di-hidrofuran-2(3H)-ona (I<sup>A</sup>) através de hidrogenação de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona em solução de alcalino



[0283]5-Hidróxi-4-(2-metilpropen-1-il)-2-furanona (3,35 g, 21,7 mmols) e água (20 mL) foram carregados em um hidrogenador. Hidróxido de potássio (1,21 g, 1 eq) depois foi carregado ao vaso e os conteúdos foram aquecidos a 40 °C até que a dissolução ocorreu. O catalisador de Pd/carbono 10 % (0,67 g) foi carregado ao vaso e os conteúdos do reator foram depois hidrogenados a 40 °C e pressão de hidrogênio 5 barg. Na conclusão da reação, a reação foi esfriada e o catalisador removido por filtração. O pH foi ajustado ao pH 2 através de adição de ácido clorídrico 36 % e a camada aquosa foi lavada com tolueno para extrair o produto desejado. Os extratos de tolueno combinados foram concentrados para fornecer o composto do título (3,17 g, 92 %).

#### Exemplo 18

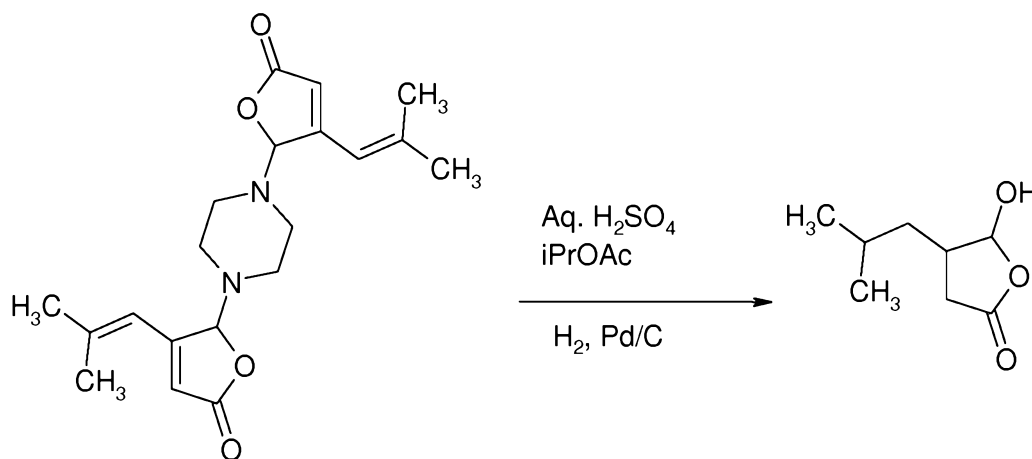
Hidrogenação de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona em solução neutra

[0284]5-Hidróxi-4-(2-metilpropen-1-il)-2-furanona foi hidrogenada em 6 mL de água por grama de material de partida com catalisador de Pd/C 10 % p/p. (22 h, 40 °C, 10 bar). Na filtração, uma fase oleosa foi separada a partir da água. Esta foi uma mistura de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)di-hidrofuran-2(3H)-ona (I<sup>A</sup>) 1:1 e 4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2-ona. O composto (I<sup>A</sup>) pode ser facilmente separado e

purificado através de uma extração de ácido-base. Esta reação foi repetida em solventes orgânicos com 2-propanol fornecendo (I<sup>A</sup>) relativamente puro.

### Exemplo 19

Preparação de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)di-hidrofuran-2(3H)-ona (I<sup>A</sup>) a partir de 5,5'-(piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) em única etapa



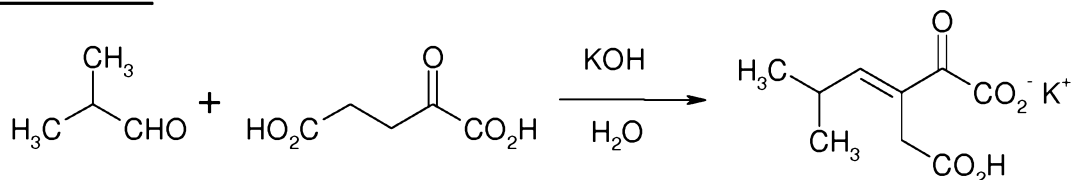
[0285]5,5'-(Piperazino-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) (50,0 g, 0,14 mol) foi carregado em água (300 mL) contendo ácido sulfúrico (16,0 g, 0,163 mol). Acetato de isopropila (200 mL) foi adicionado. Paládio em carbono 5 % úmido em água 50 % (3,0 g) foi adicionado e a mistura foi hidrogenada (hidrogênio 5 bar) na temperatura ambiente durante 15 h. A mistura de reação foi filtrada a partir de catalisador, lavada com acetato de isopropila (300 mL), isto também foi usado para lavar o vaso. A fase orgânica foi separada, lavada com água (100 mL) e concentrada em um evaporador rotatório para fornecer 38,8 g de óleo claro óleo. Isto foi um mistura de composto desejado (I<sup>A</sup>) e a lactona (4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2-ona) super-reduzida. Esta foi facilmente purificada através de extração com solução de carbonato de potássio aquosa e lavagem com tolueno. A acidificação do extrato de carbonato de potássio com ácido fórmico forneceu o produto desejado (I<sup>A</sup>) (25,6 g, 58 %).

[0286]RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> adicionado): δ 9,5 (1H), 2,8 (m, 2H), 2,40

(m,2H), 1,55 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 0,95 (m, 6H).

#### Exemplo 20

Preparação de sal de mono-potássio do ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico.

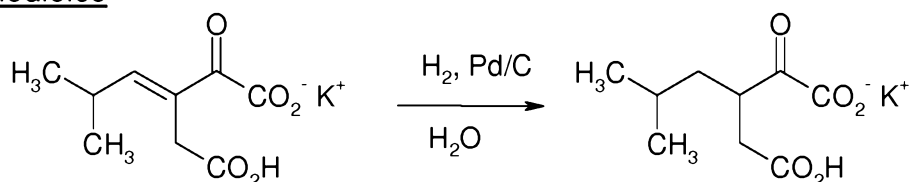


[0287]Um frasco de fundo redondo de 2 L foi carregado com 300 g de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico e 450 mL de água gelada. Com agitação e esfriamento de 314 g de hidróxido de potássio em 450 mL de água foi carregado mantendo a temperatura da etapa menor do que 25 °C. O reator foi colocado sob nitrogênio e isobutiraldeído foi adicionado a 0,2 mL/min durante 50 h. A solução amarela de duas fases resultante foi separada e lavada com 100 mL de MTBE. O menor pH da fase aquosa foi ajustado entre 3,2 a 3,4 e foi concentrado a 1/3 do volume a 65 °C sob vácuo. Depois do esfriamento a <5 °C, os sólidos resultantes foram coletados e lavados com vários pequenos volumes de água para fornecer depois de seco, 230 g de um sólido branco contendo 60 % de sal de mono-potássio do ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico e o KCl restante.

[0288]RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$  ao pH 8 a 10, 400MHz)  $\delta$  6,4 (d, 1H), 3,3 (s, 2H), 2,7 (m, 1H), 0,96 (d, 6H). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$  ao pH 8 a 10, 400MHz)  $\delta$  23 (2CH<sub>3</sub>), 31 (CH), 35 (CH<sub>2</sub>), 133 (C), 164 (CH), 170 (C), 176 (C), 182 (C).

#### Exemplo 21

Preparação de sal de mono-potássio do ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico



[0289]Uma solução aquosa de sal de mono-potássio do ácido 3-

isobutilideno-2-oxopentanodioico como gerada no exemplo 20 foi ajustada ao pH 6 a 8 e Pd/C 5 % foi adicionado e a solução foi hidrogenada a H<sub>2</sub> 10 bar a 25 °C durante 10 h. O catalisador foi removido por filtração e o pH da solução ajustada ao pH 3,8. A mistura foi esfriada a <5 °C e filtrada e lavada com uma pequena quantidade de água fria. Os cristais brancos resultantes foram secos a 40 °C sob vácuo para fornecer o composto do título, 286 g, 58 % de rendimento em 2 etapas.

[0290]RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O ao pH 8 a 10, 400MHz) δ 3,5 (m, 1H), 2,5 (dd, 1H), 2,3 (dd, 1H), 1,6 - 1,5 (m, 2H) 1,3 - 1,2 (m, 1H) 0,9 (d, 6H). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O ao pH 8 a 10, 400MHz) δ 21,7 (CH<sub>3</sub>), 22,2 (CH<sub>3</sub>), 25,5 (CH), 38,4 (CH<sub>2</sub>), 39,3 (CH<sub>2</sub>), 43,4 (CH), 167,8 (C), 170,6 (C), 180,7 (C).

### Exemplo 22

#### Expressão de Enzimas Decarboxilase em *E. coli*

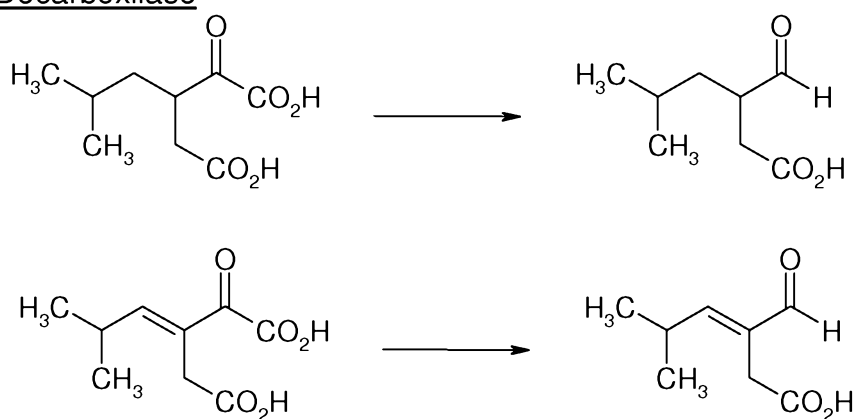
[0291]PubMed foi usada para pesquisar a literatura para enzimas decarboxilase com um amplo espectro de atividade. O programa da KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) foi usado para pesquisar decarboxilases microbianas com atividade em compostos, até certo grau, similares em estrutura ao ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico ou ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico. Sete classes de decarboxilases foram escolhidas para investigação com base em relatos de atividade em compostos com alguma similaridade estrutural. As classes de decarboxilase foram glutamato decarboxilase, diaminopimelato decarboxilase, indolpiruvato decarboxilase, ácido α-ceto decarboxilase de cadeia ramificada, L-amino-ácido aromático decarboxilase, lisina decarboxilases e benzoilformiato decarboxilase. Quarenta e uma sequências de genes para amostra, ou enzimas decarboxilase putativas foram selecionadas. Os genes foram otimizados códon para expressão em *E. coli*, sintetizados por GeneArt (Alemanha), DNA2.0 (Menlo Park, CA USA) ou Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA USA), clonados em vetor de expressão pSTRC52 (Pfizer Inc., USA), e

colocados na cepa de expressão BDG62 de *E. coli* (Pfizer Inc., USA) (Tabela 1 abaixo). Dois genes foram amplificados a partir de DNA genômico a partir dos organismos apropriados através de PCR e clonados no mesmo vetor de expressão e cepa de *E. coli*. Quatro enzimas decarboxilase foram adquiridas a partir da Sigma e testadas quanto à atividade em ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico.

[0292]Cada cepa de *E. coli* contendo o gene de decarboxilase clonado foi cultivado durante a noite em caldo LB com o antibiótico apropriado. Uma pequena quantidade (50 µL a 100 µL) da cultura de semente foi usada durante a noite para inocular 4,0 mL do meio Terrific Broth com antibióticos apropriados em tubos de cultura de 20 mm de diâmetro. As culturas foram cultivadas em uma incubadora de agitação a 32 °C e 300 rpm. Depois de 5 h de crescimento, IPTG foi adicionado à concentração final 0,4 mM para induzir a expressão da enzima. As culturas foram devolvidas à incubadora e cultivadas durante um adicional de 19 h.

### Exemplo 23

Decarboxilação de sal de potássio do ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico e sal de potássio do ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico com Enzimas Decarboxilase



[0293]As enzimas decarboxilase recombinantes foram testadas quanto à decarboxilação de ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico (XV) e ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico (XII) usando células de *E. coli* preparadas conforme descrito no exemplo 22. As reações (1 mL) foram realizadas a 37 °C em

tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,4) com decarboxilase (60 mg de células úmidas), 50 mM ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico ou ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico, ThDP (0,1 mM), e MgSO<sub>4</sub> (2,5 mM). Decarboxilação de ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico e ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico foi determinado através de um ensaio de UPLC. Uma alíquota (0,1 mL) da reação foi tratada com 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, ajustada ao pH 2,2 com ácido fosfórico) e 0,3 mL de uma solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (20 mM em 1 M HCl:acetonitrila, 3:1, v/v) durante 30 min a 50 °C. As amostras derivatizadas foram diluídas com 0,5 mL de acetonitrila, filtradas e analisadas através de UPLC em uma coluna Agilent Eclipse Plus C18 (100 mm x 3,0 mm, 1,8 µm) eluído com ácido trifluoro acético 0,1 % em água:acetonitrila (55:45, v/v) em 1,1mL/min. A coluna foi mantida a 40 °C e o efluente foi monitorado a 360 nm e espectroscopia de massas ES<sup>+</sup>. Resultados positivos foram indicados pela presença de um pico para o ácido 3-formil-5-metil-hexanoico a partir de ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico ou ácido 3-formil-5-metil-hex-3-enoico a partir de ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico. Os resultados das análises são mostrados na tabela 1.

Tabela 1

Nome da Enzima	Organismo de Fonte	Reação em (XV)	Reação em (XII)
Glutamato decarboxilases			
Aa gad	<i>Arthrobacter aurescens</i>	- <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>
Rs gad	RHA1 de <i>Rhodococcus</i> sp.	-	NT
Sc gad	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-	NT
Dz gad	<i>Dickeya zeae</i>	-	NT
Pa gad	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	-	NT
Mm gad	<i>Mycobacterium marinum</i>	-	NT
UT gad	DNA metagenômico de UTI89	-	NT
Rm gad	<i>Ralstonia metallidurans</i>	-	NT
Re gad	<i>Ralstonia eutropha</i>	-	NT
Xn gad	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	-	NT
Pd gad	<i>Photobacterium damsela</i>	-	NT
α-Ceto Ácido decarboxilase de cadeia Ramificada			
Pa bkd	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	-	-
Sv bkdA	<i>Streptomyces virginiae</i>	-	-
LI kdcA	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+
Indolpiruvato decarboxilases			
Ss ipd	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	+

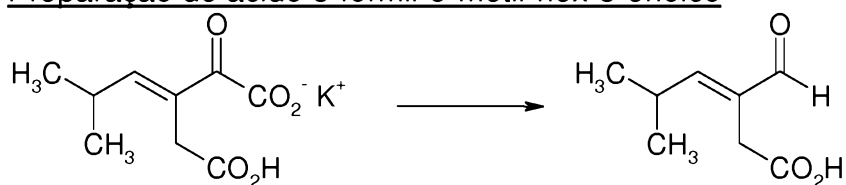


Nome da Enzima	Organismo de Fonte	Reação em (XV)	Reação em (XII)
Dd ipd	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	+	+
Bm ipd	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
Dv ipd	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	-	-
Aa ipd	<i>Aromatoleum aromaticum</i>	-	-
Ab ipd	<i>Azospirillum brasilense</i>	-	-
Bs ipd	BTai1 de <i>Bradyrhizobium</i> sp.	-	-
NC ipd	Bactéria NC10	-	-
Rr ipd	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	-	-
L-amino-ácido decarboxilases Aromáticas			
Ab dcd	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-
Pe. dcd	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
Cg dcd	<i>Chryseobacterium gleum</i>	-	-
As dcd	Fw109-5 de <i>Anaeromyxobacter</i> sp.	-	-
Bs dcd	<i>Burkholderia</i> sp. 383	+	-
Cs dcd	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	-	-
Lisina decarboxilases			
Cr lysA	<i>Candidatus Carsonella ruddii</i>	-	-
Dt lysA	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	-	-
Sa lysA	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	-	-
Benzoilformiato decarboxilases			
Rp bfd	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	+	+
Sc bfd	<i>Streptomyces coelicolor</i>	+	+
Rc bfd	<i>Ricinus communis</i>	-	-
Pp bfd	<i>Pseudomonas putida</i>	+	+
Ms bfd	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	-
As bfd	FB24 de <i>Arthrobacter</i> sp.	+	+
Pb bfd	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	+	+
Ct bfd	<i>Comamonas testosterona</i>	+	+
Dd bfd	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	+	+
Rj bfd	<i>Rhodococcus jostii</i>	+	+
Pf bfd	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+
Enzimas Purificadas (adquiridas a partir da Sigma-Aldrich)			
L-Histidina Decarboxilase	<i>Lactobacillus</i> 30a	-	NT
L-Lisina Decarboxilase	<i>Bacterium cadaveris</i>	-	NT
L-Tirosina Decarboxilase	<i>Streptococcus faecalis</i>	-	NT
Piruvato Decarboxilase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	NT

<sup>a</sup> -: Nenhuma detecção de produto apropriado

<sup>b</sup> NT: Não testada

<sup>c</sup> +: Detecção of apropriado produto

Exemplo 24Preparação de ácido 3-formil-5-metil-hex-3-enoico

[0294] Em um frasco de fundo redondo de 250 mL, 80 g de concentrado celular compreendendo *E. Coli* expressando benzoilformiato decarboxilase de *Pseudomonas putida* (veja o exemplo 23) foram carregados. A este foi adicionado uma solução ajustada ao pH 6,2 de sal de mono-potássio do ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico (10 g, veja o exemplo 20) em 50 mL de água, com 0,5 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de pirofosfato de tiamina. A pasta fluida resultante pH 6,2 foi aquecida a 50 °C e agitada durante 145 h mantendo o pH ajustado entre 6,2 e 7,2 com HCl concentrado. A mistura de reação foi esfriada na temperatura ambiente e centrifugada. Os decantados aquosos foram lavados com 50 mL de MTBE com agitação mínima. O pH da fase aquosa foi ajustado a 4 e filtrada através de celite. O filtrado foi extraído com agitação mínima três vezes com 50 mL de MTBE. O MTBE foi seco em sulfato de sódio anidro e concentrado a um óleo vermelho espesso. Este óleo foi extraído com várias porções de hexanos quentes; os hexanos combinados foram esfriados a <0° e os cristais resultantes foram isolados e secos em ar para fornecer ácido 3-formil-5-metil-hex-3-enoico como um sólido branco (0,6 g).

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$  ao pH 8 a 10, 400MHz)  $\delta$  9,2 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 3,1 (s, 2H), 2,7 (m, 1H), 1 (d, 6H)

Exemplo 25Expressão de Homólogos de Enoato Redutase em *E. coli*

[0295] A sequência de DNA correspondente ao gene para 12-oxofitodienoato redutase 1 (OPR1) de *Lycopersicon esculentum* (tomate) foi recuperada a partir do banco de dados Genbank (número de acesso AC Q9XG54) e foi sintetizada por GeneArt (Alemanha). A sequência foi otimizada no códon para expressão em *E. coli*

e foi subclonada em um plasmídeo de expressão de *E. coli* pSTRC18 (Pfizer Inc., USA). A sequência de proteína é mostrada abaixo. O constructo de expressão OPR1 foi transformado em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) conforme dirigido e durante a noite as culturas foram incubadas em meio LB + estreptomicina. A cultura LB foi usada para inocular as culturas de expressão (LB, M9Y, ou TB), que foram incubadas a 37 °C (210 rpm). Depois que a cultura atingiu uma concentração de biomassa adequada (OD 1 em A600), IPTG foi adicionado (1 mM) e as culturas foram incubados durante um adicional de 20 h (30 °C, 210 rpm). As células foram coletadas por centrifugação (4000 x g, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

[0296]O programa BLASTP foi usado para pesquisar o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes NCBI para sequências de gene relacionadas à 12-Oxofitodienoato redutase (OPR1) a partir de *Lycopersicon esculentum*. Trinta e oito sequências para genes relacionados foram selecionadas, otimizadas no códon para expressão em *E.coli* e subclonadas no plasmídeo de expressão pET28b(+)*E. coli* (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). Os constructos de expressão relacionados à OPR1 foram transformados em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) como dirigido e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB + canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivada em meio Express Instant TB durante a noite (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C, e as células foram coletas por centrifugação (4000 x g, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

[0297]Sequência de proteína de 12-oxofitodienoato redutase 1 de *Lycopersicon esculentum* (tomate):

[0298]MENKVVEEKQ VDKIPLMSPC KMGKFELCHR VVLAPLTRQR  
SYGYIPQPHA ILHYSQRSTN GLLIGEATV ISETGIGYKD VPGIWTKEQV

EAWKPIVDAV HAKGGIFFCQ IWHVGRVSNK DFQPNGEDPI SCTDRGLTPQ  
 IRSNGIDIAH FTRPRRLTTD EIPQIVNEFR VAARNAIEAG FDGVEIHGAH  
 GYLIDQFMKD QVNDRSDKYG GSLENRCRFA LEIVEAVANE IGSDRVGIRI  
 SPFAHYNEAG DTNPTALGLY MVESLNKYDL AYCHVVEPRM KTAWEKIECT  
 ESLVPMRKAY

[0299]KGTFIVAGGY DREDGNRALI EDRADLVAYG RLFISNPDLF  
 KRFELNAPLN KYNRDIFYTS DPIVGYTDYP FLETMT (SEQ ID NO. 8)

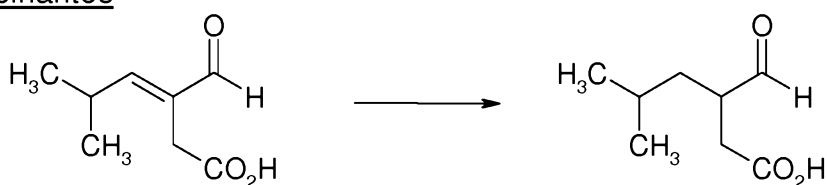
[0300]Sequência otimizada no códon de 12-Oxofitodienoato Redutase 1 de  
*Lycopersicon esculentum* (tomate):

[0301]ATGGAAAACAAAGTTGTGGAAGAAAAACAGGTTGATAAAATCCCG  
 CTGATGAGCCCGTGTAATGGGTAAATTCGAGCTGTGTCATCGCGTTGTACTG  
 GCACCGCTGACTCGTCAGCGTTCTTATGGTTACATTCCGCAGCCGCACGCAATC  
 CTGCATTACTCTCAGCGCAGCACCAACGGTGGCCTGCTGATCGGTGAAGCAAC  
 CGTGATCAGCGAAACTGGCATCGGTTACAAAGATGTGCCGGGTATCTGGACGA  
 AAGAGCAGGTTGAGGCCTGGAAACCGATCGTCGACGCGGTGCATGCCAAAGGT  
 GGTATTTTCTTTTGTGATCTGGCACGTTGGTCGTGTATCCAACAAAGATTTTC  
 AGCCGAACGGCGAAGATCCGATTTCTGTACTGACCGCGGCCTGACCCCGCAG  
 ATCCGTTCCAACGGCATTGACATTGCCCACTTCACCCGTCCACGTCGCCTGACT  
 ACTGACGAGATTCCGCAGATCGTGAACGAGTTCCGCGTTGCAGCGCGTAATGC  
 TATTGAAGCGGGTTTCGATGGCGTCGAGATTCATGGTGCCACGGTTACCTGAT  
 CGACCAATTCATGAAAGACCAAGTTAACGACCGCAGCGATAAGTATGGCGGTTC  
 TCTGGAGAACCGTTGTGCTTCGCGCTGGAAATCGTTGAAGCAGTAGCCAACG  
 AGATTGGCTCCGACCGTGTTGGTATCCGTATCTCTCCATTGACACTACAACG  
 AAGCGGGCGACACTAACCCGACCGCACTGGGCCTGTATATGGTGGAGAGCCTG  
 AATAAATACGACCTGGCGTATTGTCACGTGGTTCGAGCCGCGCATGAAAACCGC  
 CTGGGAAAAGATTGAGTGCACCGAAAGCCTGGTGCCGATGCGTAAAGCCTACA  
 AAGGCACCTTCATCGTAGCTGGTGGCTACGACCGTGAAGACGGTAACCGCGCT

CTGATCGAAGACCGTGCCGACCTGGTTGCGTACGGTCGTCTGTTTCATCAGCAA  
 CCCAGACCTGCCGAAGCGTTTTGAACTGAACGCTCCGCTGAACAAATACAACCG  
 TGACACTTTCTACACTTCCGACCCGATCGTTGGTTACACCGATTACCCGTTTCTG  
 GAAACTATGACTTAATAA (SEQ ID NO. 9)

### Exemplo 26

#### Redução de ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico com Redutases Recombinantes



[0302] Enoato redutases recombinantes foram testadas quanto à redução do ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico usando células de *E. coli* preparadas conforme descrito no exemplo 25. As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) com células de *E. coli* (100 mg de células úmidas/mL), NADPH (10 mM), NADH (10 mM) e ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico (10 mM). Depois de 16 h, acetonitrila (0,5 ml) foi adicionada a cada reação e as misturas resultantes foram centrifugadas (2000 rpm x 5 min). Alíquotas (0,1 mL) dos sobrenadantes resultantes foram tratadas com 0,1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, ajustada ao pH 2,2 com ácido fosfórico) e 0,225 mL de uma solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (20 mM em 1 M HCl:acetonitrila, 3:1, v/v) durante 30 min a 50 °C. As amostras derivatizadas foram diluídas com 0,225 mL de acetonitrila e analisadas através de HPLC em uma coluna de Amilose-2 Phenomenex Lux 5 µ (250 mm x 4,6 mm id) eluído com ácido trifluoroacético 0,1 % em água:acetonitrila (65:35, v/v) em 2mL/min. A coluna foi mantida a 50 °C e o efluente foi monitorado a 360 nm. Os resultados das análises de HPLC são mostrados na tabela 2.

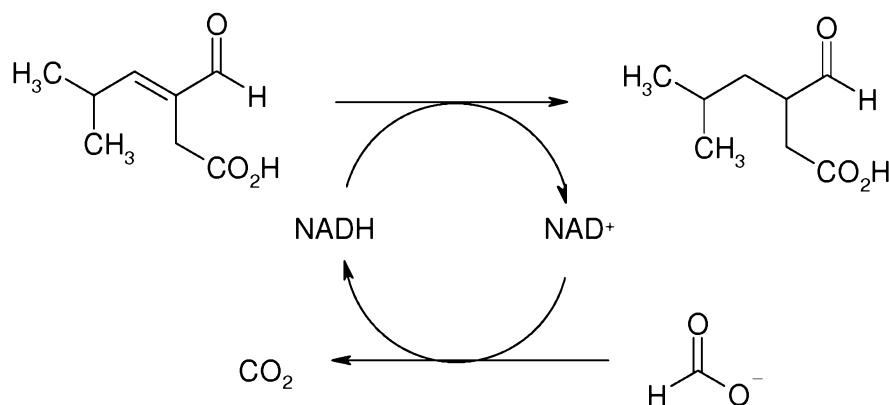
### Tabela 2

Entrada	Nome/Fonte da Enzima	Número de Acesso	% de Conversão <sup>1</sup>
1	Enzima amarela velha 1/ <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Q02899	6,5
2	Enzima amarela velha 2/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q03558	9,2
3	Enzima amarela velha 3/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P41816	8,6
4	NADH:flavina oxidoreductase/ <i>Zymomonas mobilis</i>	Q5NLA1	85,0
5	fumarato redutase/ <i>Shewanella frigidimarina</i>	Q07WU7	3,4
6	Pentaeritritol tetranitrato redutase / <i>Enterobacter cloacae</i>	Q6JL81	85,6
7	Enzima não denominada/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	BAH57049	3,7
8	Alil álcool desidrogenase/ <i>Nicotiana tabacum</i>	BAA89423	5,0
9	aldeído artemisinico delta-11(13) redutase/ <i>Artemisia annua</i>	1WLY_A	37,1
10	2-haloacrilato redutase/ <i>Burkholderia sp. WS</i>	NP_390263	4,2
11	NADPH desidrogenase/ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	YP_390263	82,8
12	NADH:flavina oxidoreductase/NADH oxidase/ <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	YP_001664021	54,9
13	Enzima não denominada/ <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	CAA71086	6,0
14	Enzima não denominada/ <i>Moorella thermoautotrophica</i>	Q2RGT7	4,8
15	oxofitodienoato redutase (OPR1)/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	Q9XG54	31,4
16	Oxofitodienoato redutase (OPR3)/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	Q9FEW9	15,7
17	N-etilmaleimida redutase/ <i>Shigella sonnei</i>	Q3Z206	100,0
18	ácido 12-oxo-fitodienoico redutase/ <i>Zea mays</i>	Q49HE0	100,0
19	ácido 12-oxo-fitodienoico redutase/ <i>Zea mays</i>	Q49HE4	100,0
20	Enzima não denominada/ <i>Vitis vinifera</i>	A5BF80	7,5
21	Enzima não denominada/ <i>Populus trichocarpa</i>	B9MWG6	100,0
22	12-oxofitodienoato redutase/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GYB8	100,0
23	12-oxofitodienoato redutase/Mamona bean	B9SK95	5,4
24	NADH:flavina oxidoreductase/NADH oxidase/ <i>Klebsiella variicola</i>	D0YIM0	100,0

Entrada	Nome/Fonte da Enzima	Número de Acesso	% de Conversão <sup>1</sup>
25	Enzima não denominada/ <i>Citrobacter koseri</i>	A8AH31	100,0
26	N-etilmaleimida redutase/ <i>Citrobacter sp.</i>	C1M473	100,0
27	N-etilmaleimida redutase/ <i>Citrobacter rodentium</i>	D2THI8	100,0
28	N-etilmaleimida redutase/ <i>Salmonella paratyphi</i>	Q5PH09	100,0
29	N-etilmaleimida redutase/ <i>Cronobacter turicensis</i>	C9Y3L1	100,0
30	Enzima não denominada/ <i>Providencia stuartii</i>	B2Q290	100,0
31	NADPH desidrogenase/ <i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6CI57	9,1
32	N-etilmaleimida redutase/ <i>Pseudomonas putida</i>	Q88I29	17,4
33	12-oxofitodienoato redutase/ <i>Pichia stipitis</i>	150864790	7,8
34	NAPDH desidrogenase/ <i>Pichia stipitis</i>	126131638	12,6
35	Enzima não denominada/ <i>Pichia guilliermondii</i>	146393506	21,6
36	Enzima não denominada/ <i>Candida glabrata</i>	50293551	36,5
37	Enzima não denominada/ <i>Debaryomyces hansenii</i>	50405397	9,1
38	Enzima não denominada/ <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	Q5KXG9	100,0
39	Oxofitodienoato redutase (OPR2)/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	Q9XG54	14,0
<sup>1</sup> % de Conversão de ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico			

### Exemplo 27

Redução de ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico com Redutases Recombinantes e Formiato Desidrogenase



[0303] Enoato redutases recombinantes foram avaliadas quanto à redução de ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico com NAD<sup>+</sup> e formiato desidrogenase. Enoato redutases foram expressadas em células de *E. coli* conforme descrito no exemplo 25. Formiato desidrogenase foi expressada em células de *E. coli* como segue: O constructo de expressão de formiato desidrogenase pET26b foi transformado em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) conforme dirigido e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB + canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em meio Express Instant TB + canamicina durante a noite (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C, e as células foram coletadas por centrifugação (4000 x *g*, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C. Uma variante (D74M) de oxofitodienoato redutase 3 (Número de acesso Q9FEW9) foi expressada em células de *E. coli*, como segue: kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange a partir da Stratagene (La Jolla, CA, USA) foi usado para criar variante de oxofitodienoato redutase 3 D74M, conforme dirigido. Os *primers* foram ordenados a partir da Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). O constructo de expressão de oxofitodienoato redutase 3 (OPR3) pSTRC18 foi transformado em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), conforme dirigido, e durante a noite as culturas foram cultivadas em caldo de expansão + estreptomicina (Zymo Research, Irvine, CA, USA). As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em



caldo de Superexpressão + estreptomicina (Zymo Research, Irvine, CA, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 23 °C, e as células foram coletadas através de centrifugação (4000 x *g*, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

[0304]As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) com enoato redutases (40 mg de células úmidas/mL), formiato desidrogenase (80 mg de células úmidas/mL), NAD<sup>+</sup> (0,02 mM), formiato de amônio (30 mM) e ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico (20 mM). Depois de 24 h, as misturas de reação foram acidificadas com 0,025 mL de HCl 4 N e extraídas com 1 mL de acetato de etila. As alíquotas (0,5 mL) dos extratos de acetato de etila (0,5 mL) foram secas em sulfato de sódio anidro e tratadas com metanol (0,02 mL) e (trimetilsilil)diazometano (0,01 mL de uma solução em éter dietílico 2 M) para derivatizar as porções de ácido carboxílico em seus ésteres metílicos correspondentes. As amostras derivatizadas foram analisadas através de GC em uma coluna ChiralDEX™ G-TA (coluna 30 M x 0,25 mm, temperatura da coluna: isotérmica 135 °C, temperatura do injetor: 200 °C, gás portador: hélio, taxa de fluxo aproximadamente 1 mL/min) para fornecer os resultados mostrados na tabela 3.

Tabela 3

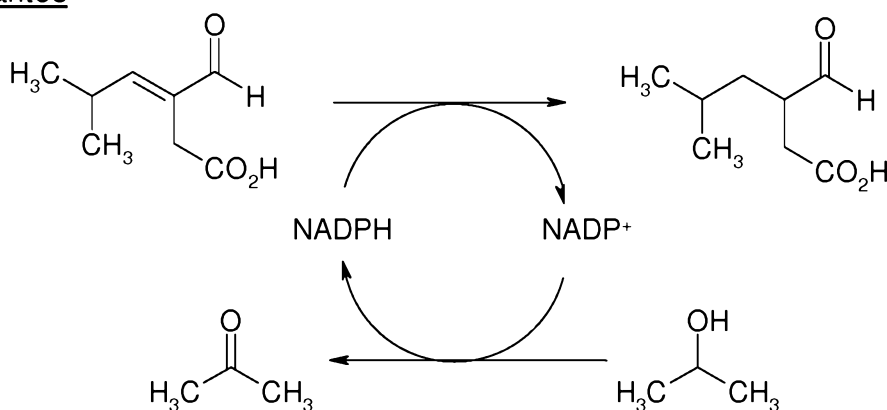
Entrada	Nome/Fonte da Enzima	Número de Acesso	% de Conversão <sup>1</sup>
1	NADH:flavina oxidorreductase/ <i>Zymomonas mobilis</i>	Q5NLA1	23,8
2	Pentaeritritol tetranitrato redutase/ <i>Enterobacter cloacae</i>	Q6JL81	19,6
3	NADPH desidrogenase/ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	YP_390263	17,0
4	NADH:flavina oxidorreductase/NADH oxidase/ <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	YP_001664021	15,9
5	oxofitodienoato redutase (OPR 3) variante D74M/ <i>Lycopersicon esculentum</i>		43,5
6	N-etilmaleimida redutase/ <i>Shigella sonnei</i>	Q3Z206	24,0

Entrada	Nome/Fonte da Enzima	Número de Acesso	% de Conversão <sup>1</sup>
7	Enzima não denominada/ <i>Populus trichocarpa</i>	B9MWG6	31,8
8	N-etilmaleimida redutase/ <i>Citrobacter sp.</i> 30_2	C1M473	22,8
9	N-etilmaleimida redutase/ <i>Cronobacter turicensis</i> DSM 18703	C9Y3L1	26,3
10	Enzima não denominada/ <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	Q5KXG9	21,7
11	12-oxofitodienoato redutase (OPR1)/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	Q9XG54	39,8
<sup>1</sup> % de Conversão de ácido ( <i>E</i> )-3-formil-5-metil-hex-2-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico (todas as reações forneceram aproximadamente misturas 1:1 de ( <i>S</i> )- e ( <i>R</i> )-enantiômeros)			

### Exemplo 28

#### Redução de ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico com Redutases

#### Recombinantes



[0305] Enoato redutases recombinantes foram avaliadas quanto à redução de ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico com NADP<sup>+</sup> e álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis* (X-zime). Enoato redutases foram expressadas em células de *E. coli* conforme descrito no exemplo 25. Uma variante (D74M) de oxofitodienoato redutase 3 (OPR3) foi preparado conforme descrito no exemplo 27. As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) com enoato redutases (40 mg de células úmidas/mL), álcool desidrogenase de

*Lactobacillus brevis* (32 U/mL), NADP<sup>+</sup> (0,02 mM), 2-propanol (vol 3 %) e ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico (20 mM). Depois de 24 h, as misturas de reação foram acidificadas com 0,025 mL de HCl 4 N e extraídas com 1 mL de acetato de etila. As alíquotas (0,5 mL) dos extratos de acetato de etila (0,5 mL) foram secas em sulfato de sódio anidro e tratadas com metanol (0,02 mL) e (trimetilsilil)diazometano (0,01 mL de uma solução em éter dietílico 2 M) para derivatizar porções de ácido carboxílico em seus ésteres metílicos correspondentes. As amostras derivatizadas foram analisadas através de GC em uma coluna ChiralDEX™ G-TA (coluna 30 M x 0,25 mm, temperatura da coluna: isotérmica 135 °C, temperatura do injetor: 200 °C, gás portador: hélio, taxa de fluxo aproximadamente 1 mL/min) para fornecer os resultados mostrados na tabela 4.

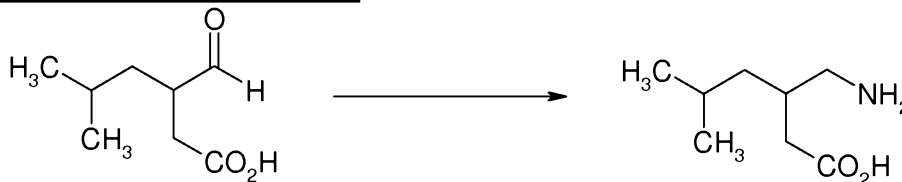
Tabela 4

Entrada	Nome/Fonte da Enzima	Número de Acesso	% de Conversão <sup>1</sup>
1	NADH:flavina oxidoreductase/ <i>Zymomonas mobilis</i>	Q5NLA1	73,0
2	Pentaeritritol tetranitrato redutase/ <i>Enterobacter cloacae</i>	Q6JL81	100,0
3	NADPH desidrogenase/ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	YP_390263	100,0
4	NADH:flavina oxidoreductase/NADH oxidase/ <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	YP_001664021	100,0
5	oxofitodienoato redutase (OPR 3) variante D74M/ <i>Lycopersicon esculentum</i>		96,8
6	N-etilmaleimida redutase/ <i>Shigella sonnei</i>	Q3Z206	100,0
7	Enzima não denominada/ <i>Populus trichocarpa</i>	B9MWG6	100,0
8	N-etilmaleimida redutase/ <i>Citrobacter</i> sp. 30_2	C1M473	100,0
9	N-etilmaleimida redutase/ <i>Cronobacter turicensis</i> DSM 18703	C9Y3L1	99,5
10	Enzima não denominada/ <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	Q5KXG9	100,0
11	12-oxofitodienoato redutase (OPR1)/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	Q9XG54	34,3
<sup>1</sup> % de Conversão de ácido ( <i>E</i> )-3-formil-5-metil-hex-2-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico (todas as reações forneceram aproximadamente misturas 1:1 de ( <i>S</i> )- e ( <i>R</i> )-enantiômeros)			

Exemplo 29Preparação de ácido 3-formil-5-metil-hexanoico

[0306]Um vaso de reação foi carregado com tampão fosfato de potássio 7,5 mL (0,1 M, pH 7,0), NADP<sup>+</sup> 8,4 mg, álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis* 0,2 mL (32 U/mL, X-zime), 2-propanol 0,3 mL, tetranitrato de pentaeritritol redutase (2 mL de uma suspensão de células de *E. coli* 200 mg/mL em tampão fosfato de potássio), e 156 mg de ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico, e agitado a 40 °C. Depois de 6,75 h, a mistura de reação foi centrifugada e o sobrenadante foi ajustada ao pH 2 com HCl 4 N e extraída com acetato de etila (2 x 10 mL). O extrato de acetato de etila foi seco em sulfato de magnésio anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida para fornecer 141 mg de óleo incolor (89 % de rendimento).

[0307]RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O ao pH 8 a 10) δ 2,53 - 2,43 (m, 2 H), 2,34 - 2,28 (m, 1H), 1,53 - 1,42 (m, 1H), 1,41 - 1,34 (m, 1H), 1,20 - 1,12 (m, 1H), 0,76 (d, 3H), 0,74 (d, 3H).

Exemplo 30Biotransformação de ácido 3-formil-5-metil-hexanoico em pregabalina com ω-transaminases recombinantes.

[0308]A transaminação de ácido 3-formil-5-metil-hexanoico para formar Pregabalina foi avaliada com várias transaminases recombinantes. ω-Transaminases recombinantes a partir de *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides*, e *Paracoccus denitrificans* foram expressadas em *E. coli* como segue: Os constructos de expressão de ω-transaminase pET28b foram transformados em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), conforme dirigido, e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB +

canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em meio Express Instant TB + canamicina durante a noite (Novagen, EMD Produtos Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C, e as células foram coletadas através de centrifugação (4000 x g, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

[0309]As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0), fosfato de piridoxal (2 mM), isopropilamina (150 mM), ácido 3-formil-5-metil-hexanoico (50 mM) e  $\omega$ -transaminase (40 mg de células úmidas/mL) a partir de *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides*, ou *Paracoccus denitrificans*. Depois de 24 h, as amostras de reação (0,1 mL) foram diluídas com acetonitrila:água (1:1, v/v) 0,4 mL. As alíquotas (0,05 mL) das amostras de reação diluídas foram tratadas com bicarbonato de sódio aquoso saturado (0,01 mL) e reagente de Marfey (*N*- $\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)alaninamida, 0,2 mL de solução em acetonitrila 5 g/L) a 40 °C. Depois de 1 h, as reações derivatizadas foram interrompidas com ácido clorídrico aquoso 1 N 0,01 mL e diluídas com 0,23 mL de acetonitrila. As amostras de reação derivatizadas foram analisadas através de UPLC (coluna: BEH C18, 50 mm x 2,1 mm id, eluição por gradiente: A 70 %:B 30 % a A 55 %:B 45 % em 5 min (A = trietilamina 1 % (pH 3 com ácido fosfórico); B = acetonitrila), taxa de fluxo: 0,8 mL/min, temperatura da coluna: 30 °C, detecção: 210 a 400 nm) para fornecer os resultados mostrados na tabela 5.

Tabela 5

Entrada	Enzima	Número de Acesso	% de Rendimento de Pregabalina	% de ee de (S)- Pregabalina
1	$\omega$ -transaminase de <i>Vibrio fluvialis</i>	AEA39183	37,5	60,6
2	$\omega$ -transaminase de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	YP_001043908	24	84,4
3	$\omega$ -transaminase de <i>Paracoccus denitrificans</i>	YP_917746	44	60,6

Exemplo 31

Biotransformação de ácido 3-formil-5-metil-hexanoico em pregabalina com  $\omega$ -transaminases recombinantes.



[0310]Variantes recombinantes de *Vibrio fluvialis* foram testadas quanto à aminação redutiva de ácido 3-formil-5-metil-hexanoico para formar Pregabalina. Variantes de  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis* (Número de acesso AEA39183) foram expressadas em *E. coli*, como segue: kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange a partir da Stratagene (La Jolla, CA, USA) foi usado para criar variantes de aminotransferase de *V. fluvialis*, conforme dirigido. Os *primers* foram ordenados a partir de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Os constructos de expressão  $\omega$ -transaminase pET28b foram transformados em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), conforme dirigido, e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB + canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em meio Express Instant TB + canamicina durante a noite (Novagen, EMD Produtos Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C, e as células foram coletadas através de centrifugação (4000 x *g*, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

[0311]As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) com fosfato de piridoxal (2 mM), isopropilamina (300 mM), ácido 3-formil-5-metil-hexanoico (100 mM) e  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis* do tipo selvagem ou variantes (40 mg de células úmidas/mL). Depois de 28 h, as amostras de reação (0,1 mL) foram diluídas com acetonitrila:água (1:1, v/v) 0,4 mL. As alíquotas (0,05 mL) das amostras de reação diluídas, foram tratadas com bicarbonato de sódio aquoso saturado (0,01 mL) e reagente de Marfey (*N*- $\alpha$ -(2,4-

dinitro-5-fluorofenil)alaninamida, 0,2 mL de solução em acetonitrila 5 g/L) a 40 °C. Depois de 1 h, as reações derivatizadas foram interrompidas com ácido clorídrico aquoso 1 N 0,01 mL e diluídas com 0,23 mL de acetonitrila. As amostras de reação derivatizadas foram analisadas através de UPLC (coluna: BEH C18, 50 mm x 2,1 mm id, eluição por gradiente: A 70 %:B 30 % a A 55 %:B 45 % em 5 min (A = trietilamina 1 % (pH 3 com ácido fosfórico); B = acetonitrila), taxa de fluxo: 0,8 mL/min, temperatura da coluna: 30 °C, detecção: 210 a 400 nm) para fornecer os resultados mostrados na tabela 6.

**Tabela 6**

Entrada	variante de $\omega$ -transaminase de <i>V. fluvialis</i>	% de Conversão	% de ee
1	W57F/K163L/R415F	6,1	81,1
2	Y165F	9,5	75,3
3	W147N	10,0	75,0
4	A228G	32,3	74,9
5	N166V	16,6	74,5
6	W57F/A228G	33,3	73,9
7	V156M	13,2	70,3
8	S159A	7,9	70,2
9	W57F/R415F	10,7	68,5
10	R415F	11,8	68,1
11	M59N	10,1	68,0
12	P301K	19,1	67,6
13	Y113F	7,9	65,2
14	F86G	32,1	64,1
15	I254V	32,1	64,0
16	H326N	15,9	63,8
17	C414I	10,1	63,0
18	W57F/K163L/V153A	46,1	41,2
19	W57F/K163L	43,5	36,1
20	D21Y	45,1	34,2
21	W57F/D21Y	46,3	34,0
22	M294V	42,4	33,2
23	W57F/M294V	41,2	32,5
24	W57F/V177I	39,9	29,0
25 <sup>1</sup>	Vat 565	20,0	90,5
26 <sup>1</sup>	Vfat665	15,0	93,1
27 <sup>1</sup>	Vfat701	9,0	94,4
28 <sup>1</sup>	Vfat707	7,5	95,7

Entrada	variante de $\omega$ -transaminase de <i>V. fluvialis</i>	% de Conversão	% de ee
29 <sup>1</sup>	Vfat747	50,0	97,5
30 <sup>1</sup>	Vfat825	75,0	95,7
31 <sup>1</sup>	Vfat 850	81,3	94,6
32 <sup>1</sup>	Vfat 875	80,5	95,1
33 <sup>1</sup>	Vfat888 <sup>2</sup>	95,0	95,5

[0312]Nota - 1: Entrada 25 a 33 – as reações foram realizadas usando 400 mM de ácido 3-formil-5-metil-hexanoico, PLP 3 mM, IPM 800 mM a 45 °C.

[0313]2: Vfat 888:

[0314]SEQUÊNCIA de DNA

[0315]ATGAATAAACCAACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACCAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAAATCCTGACTCGTAACAACGCATACCACGGTGTAACCTGCTGTTTCCGCT  
TCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTT  
CGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG  
AAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGT  
GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG  
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT  
ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC  
TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
CCGGAACTGGCGAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
GCACGGCTTTACGGCCAGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG



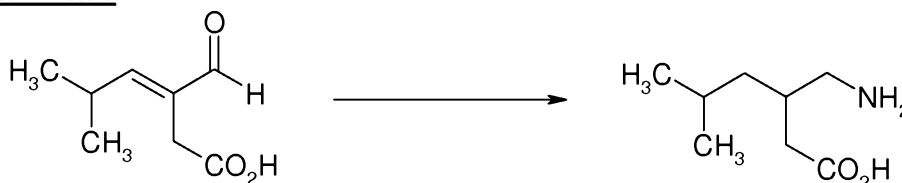
CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
TAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCGAGCGTATCGCTAACACCTG  
TACCGACCTGGGCCTGATCTGTAGCCCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGTGCC  
CGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAG  
AAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 10)

### SEQUÊNCIA DE AMINO ÁCIDOS

[0316]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNNGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTA  
VSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
ALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 2)

### Exemplo 32

[0317]Redução enzimática de ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico e conversão *in situ* em pregabalina com  $\omega$ -transaminase



[0318]A redução de ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico com tetranitrato de pentaeritritol redutase e conversão *in situ* em pregabalina foi avaliada com várias  $\omega$ -transaminases.  $\omega$ -Transaminases

recombinantes a partir de *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides*, e *Paracoccus denitrificans* foram expressadas em *E. coli*, como segue: Os constructos de expressão de  $\omega$ -transaminase pET28b foram transformados em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), conforme dirigido, e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB + canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em meio Express Instant TB + canamicina durante a noite (Novagen, EMD Produtos Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C, e as células foram coletadas através de centrifugação (4000 x *g*, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

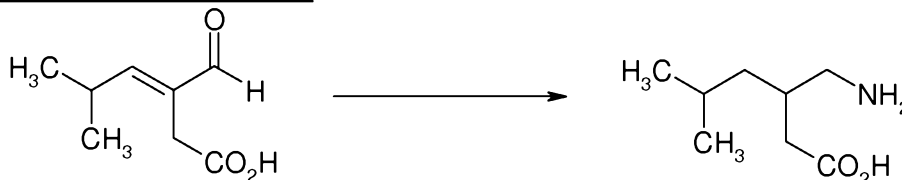
[0319]As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) com tetranitrato de pentaeritritol redutase (40 mg de células úmidas/mL), álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis* (32 U/mL), NADP<sup>+</sup> (0,02 mM), 2-propanol (vol 3 %), fosfato de piridoxal (2 mM), isopropilamina (100 mM), ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico (20 mM) e  $\omega$ -transaminase (40 mg de células úmidas/mL) a partir de *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides*, ou *Paracoccus denitrificans*. Depois de 43 h, as amostras de reação (0,1 mL) foram diluídas com acetonitrila:água (1:1, v/v) 0,1 mL. As alíquotas (0,1 mL) das amostras de reação diluídas foram tratadas com bicarbonato de sódio aquoso saturado (0,01 mL) e reagente de Marfey (*N*- $\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)alaninamida, 0,4 mL de solução em acetonitrila 5 g/L) a 40 °C. Depois de 1 h, as reações derivatizadas foram interrompidas com ácido clorídrico aquoso 1 N 0,1 mL. As amostras de reação derivatizadas foram analisadas através de UPLC (coluna: BEH C18, 50 mm x 2,1 mm id, eluição por gradiente: A 70 %:B 30 % a A 55 %:B 45 % em 5 min (A = trietilamina 1 % (pH 3 com ácido fosfórico); B = acetonitrila), taxa de fluxo: 0,8 mL/min, temperatura da coluna: 30 °C, detecção: 210 a 400 nm) para fornecer os resultados mostrados na tabela 7.

Tabela 7

Entrada	Enzima	Número de Acesso	% de Rendimento de Pregabalina	% de ee de (S)-Pregabalina
1	$\omega$ -transaminase de <i>Vibrio fluvialis</i>	AEA39183	60,8	42,0
2	$\omega$ -transaminase de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	YP_001043908	60,4	54,6
3	$\omega$ -transaminase de <i>Paracoccus denitrificans</i>	YP_917746	33,6	61,5

Exemplo 33

[0320] Redução enzimática de ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico e conversão *in situ* em pregabalina com  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis*



[0321] A redução de ácido (E)-3-formil-5-metil-hex-3-enoico em ácido 3-formil-5-metil-hexanoico com tetranitrato de pentaeritritol redutase e conversão *in situ* em pregabalina foram avaliadas com variantes de aminotransferase de *V. fluvialis*. Variantes de  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis* (Número de acesso AEA39183) foram expressadas em *E. coli*, como segue: kit de mutagênese sítio-dirigidas QuikChange a partir de Stratagene (La Jolla, CA, USA) foi usado para criar variantes de aminotransferase de *V. fluvialis*, conforme dirigido. Os *primers* foram ordenados a partir de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Os constructos de expressão  $\omega$ -transaminase pET28b foram transformados em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), conforme dirigido, e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB + canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em meio Express Instant TB + canamicina durante a noite (Novagen, EMD Produtos Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C,

e as células foram coletadas através de centrifugação (4000 x *g*, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

[0322]As reações (0,5 mL) foram realizadas a 30 °C em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) com tetranitrato de pentaeritritol redutase (40 mg de células úmidas/mL), álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis* (32 U/mL), NADP<sup>+</sup> (0,1 mM), 2-propanol (vol 3 %), fosfato de piridoxal (2 mM), isopropilamina (300 mM), ácido (*E*)-3-formil-5-metil-hex-2-enoico (100 mM) e  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis* tipo selvagem ou variantes (40 mg de células úmidas/mL). Depois de 48 h, as amostras de reação (0,02 mL) foram diluídas com acetonitrila:água (1:1, v/v) 0,18 mL. As alíquotas (0,1 mL) das amostras de reação diluídas foram tratadas com bicarbonato de sódio aquoso saturado (0,01 mL) e reagente de Marfey (*N*- $\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)alaninamida, 0,4 mL de solução em acetonitrila 5 g/L) a 40 °C. Depois de 1 h, as reações derivatizadas foram interrompidas com ácido clorídrico aquoso 1 N 0,1 mL. As amostras de reação derivatizadas foram analisadas através de UPLC (coluna: BEH C18, 50 mm x 2,1 mm id, eluição por gradiente: A 70 %:B 30 % a A 55 %:B 45 % em 5 min (A = trietilamina 1 % (pH 3 com ácido fosfórico); B = acetonitrila), taxa de fluxo: 0,8 mL/min, temperatura da coluna: 30 °C, detecção: 210 a 400 nm) para fornecer os resultados mostrados na tabela 8.

Tabela 8

Entrada	Variante de transaminase de <i>V. fluvialis</i>	% de Rendimento de Pregabalina	% de ee de (S)-Pregabalina
1	M294V	64,8	73,7
2	T268M	47,4	77,8
3	P233L	77,3	71
4	N166V	38,1	73,1
5	C424A	76,5	70,6
6	L100M	83,7	71,4
7	S283A	68,1	71
8	L417M	68,7	71,8
9	Tipo selvagem	62,7	61,5

Exemplo 34

Variantes alternativas de  $\omega$ -transaminase de *Vibrio fluvialis*

[0323]Em seguida, outras variantes recombinantes de  $\omega$ -transaminase de *Vibrio fluvialis* foram expressadas em *E. coli*, conforme segue: Os constructos de expressão  $\omega$ -transaminase pET28b foram transformados em BL21(DE3) *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), conforme dirigido, e durante a noite as culturas foram cultivadas em meio LB + canamicina. As culturas de LB foram usadas para inocular as culturas de expressão cultivadas em meio Express Instant TB + canamicina durante a noite (Novagen, EMD Produtos Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). As culturas foram incubadas durante 20 h a 30 °C, e as células foram coletadas através de centrifugação (4000 x *g*, 30 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C.

Exemplo 34a: Vfat906

[0324]Sequência de DNA:

[0325]ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACgAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAAATCCTGACTCGTaacAACGCATACCACGGTGTAACCTGCTGTTTCCGCTT  
CCATGACGGGTCTGCCGTACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTC  
GTTACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGA  
AGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTG  
AAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGG  
CGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGC

GTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTA  
 CCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT  
 CCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTC  
 CGGAACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCG  
 CACGGCTTTACGGCCggcGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAGCA  
 ATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACC  
 GCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATA  
 TCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATCTAA  
 AACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCaaaCGTATCGCTAACACCTGTcag  
 GACCTGGGCCTGATCTGTAGCgCGCTGGGTGAGTCCGTTATCCTGTGCCCGCC  
 GTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAAGG  
 CTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 11)

Sequência de aminoácidos:

[0326]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVN  
 GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
 VEVSPFDSGRVFYTNNGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTA  
 VSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
 EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
 GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
 GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
 DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
 ALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 3)

Exemplo 34b: Vfat999

Sequência de DNA:

[0327]ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCT  
 CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
 ACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGG

ACGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTG  
 ATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTC  
 GGTCTGATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCT  
 CCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGAT  
 ACTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAA  
 ACGCAAATCCTGACTCGTCAAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGCTGTTTCCGC  
 TTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTT  
 TCGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACC  
 GAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACG  
 TGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCG  
 GGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCT  
 GCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCTG  
 TACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCAT  
 CTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGG  
 TCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCC  
 CGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAA  
 GCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGC  
 ACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTG  
 AATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCAT  
 CTAACACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCT  
 GTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGC  
 CCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
 GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 12)

Sequência de aminoácidos:

[0328]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVN  
 GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
 VEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA

VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
 EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
 GCVTYDFTPDAIISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
 GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
 DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
 ALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 4)

Exemplo 34c: Vfat1010

Sequência de DNA:

[0329]ATGAATAAACCAACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCT  
 CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
 ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
 CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
 CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
 GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
 CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
 CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
 CGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGTTTCCGCT  
 TCCATGACGGGTATGCCGCACAACTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTT  
 CGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG  
 AAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGT  
 GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG  
 GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
 CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT  
 ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC  
 TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
 CCGGCACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
 GCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG



CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
 CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
 ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
 TAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGT  
 CAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCC  
 GCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAA  
 GGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 13)

Sequência de aminoácidos:

[0330]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVN  
 GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
 VEVSPFDSGRVFYTNNGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
 VSASMTGMPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQ  
 REGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNT  
 WGCVTYDFTPDAIISSKNLTAGFFPVGAVILGPALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGH  
 PVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEA  
 VKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDK  
 LEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 5)

Exemplo 34d: Vfat1020

Sequência de DNA:

[0331]ATGAATAAACCCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCT  
 CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
 ACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGG  
 ACGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTG  
 ATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTC  
 GGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCT  
 CCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGAT  
 ACTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAA

ACGCAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGCTGTTTCCGC  
TTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTT  
TCGTTACCTGGGTTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACC  
GAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACG  
TGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCG  
GGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCT  
GCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCG  
TACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCAT  
CTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGG  
TCCGGAACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCC  
CGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAA  
GCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGC  
ACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTG  
AATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCAT  
CTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCT  
GTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGC  
CCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 14)

Sequência de aminoácidos:

[0332]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNIGEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPFILTEAQMDDEMFDKLE

KALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 6)

Exemplo 34e: Vfat1030

Sequência de DNA:

[0333]ATGAATAAACCAACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCCACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACGTATTGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGTTTCCGCT  
TCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTT  
CGTTCACCTGAGCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG  
AAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGT  
GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG  
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT  
ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC  
TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
CCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
GCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG  
CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
TAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGT  
CAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCC

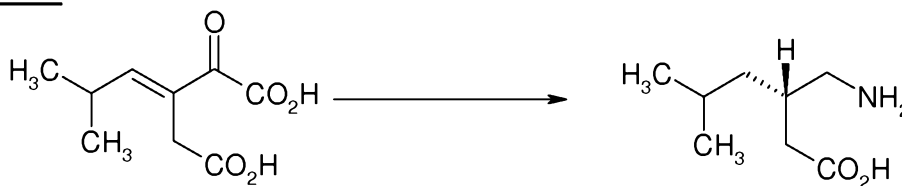
GCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAACTGGAGAA  
GGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 15)

Sequência de aminoácidos:

[0334]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVTHGEGPYIVDVH  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNNGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLE  
KALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 7)

### Exemplo 35

Biotransformação de ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico em Pregabalina



[0335]Os genes para a benzoilformiato decarboxilase de *Pseudomonas putida*, tetranitrato de pentaeritritol redutase de *Enterobacter cloacae*, álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis*, e  $\omega$ -transaminase de *Vibrio fluvialis* foram clonados no vetor de expressão pDSTRC52 (Pfizer Inc., USA) e colocados na cepa de expressão de *E. coli* BDG62 (Pfizer Inc., USA). A cultura foi cultivada e produção de enzima foi induzida conforme descrito no exemplo 22. A expressão de enzima foi determinada através de eletroforese em gel de poliácridamida usando géis e pigmentações Novex (Invitrogen Corporation Carlsbad, Califórnia).

[0336]As reações (1,0 mL) foram realizadas a 40 °C em tampão fosfato (100

mM, pH 6,4) com decarboxilase de *P. putida*, transaminase de *V. fluvialis*, álcool desidrogenase de *L. brevis*, tetranitrato de pentaeritritol redutase de *E. cloacae* e NADP (0,1 mM) em uma célula. Ácido 3-isobutilideno-2-oxopentanodioico 1 M 200 µL, ThDp 1 mM 100 µL + MgSO<sub>4</sub> 25 mM, PLP 50 mM 40 µL, isopropanol 30 µL, isopropilamina 2 M 250 µL. Ajustar o pH ao 6,4 durante 24 horas, depois ajustar o pH ao 6,8 durante um adicional de 24 horas. Uma alíquota (0,5 mL) da reação foi tratada com bicarbonato de sódio aquoso 1 M (0,05 mL) e reagente de Marfey (*N*-α-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)alaninamida, 0,5 mL de solução em acetonitrila 5 g/L) a 40 °C. Depois de 1 h, as reações derivatizadas foram interrompidas com ácido clorídrico aquoso 1 N 0,05 mL. As amostras de reação derivatizadas foram filtradas e analisadas através de UPLC (coluna: coluna Agilent Eclipse Plus C18 (100 mm x 3,0 mm, 1,8 µm), eluídas com ácido trifluoro acético 0,1 % em água:acetonitrila (60:40, v/v) a 1,3 mL/min. A coluna foi mantida a 30 °C e o efluente foi monitorado a 340 nm e espectroscopia de massas ES<sup>+</sup>. A reação forneceu uma pequena quantidade de Pregabalina, da qual 82 % foi o S-isômero desejado.

### Exemplo 36

#### Biotransformação de ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico em Pregabalina



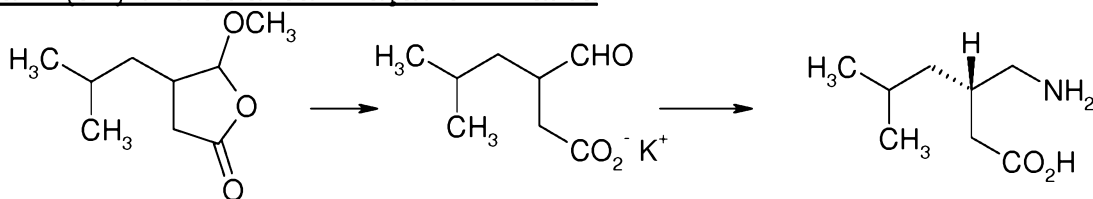
[0337] Os genes para a benzoilformiato decarboxilase de *Pseudomonas putida* e ω-transaminase de *Vibrio fluvialis* foram clonados no vetor de expressão pDSTRC52 (Pfizer Inc., USA) e colocados na cepa de expressão de *E. coli* BDG62 (Pfizer Inc., USA). A cultura foi cultivada e a produção de enzima foi induzida, conforme descrito no Exemplo 22. A expressão da enzima foi determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida usando géis e pigmentações Novex

(Invitrogen Corporation Carlsbad, Califórnia).

[0338]As reações (2,0 mL) foram realizadas a 40 °C em tampão fosfato (100 mM, pH 6,4) com 500 µL de cultura (42,5 mg de peso celular seco) a partir de tanques de fermentação de 24 horas com decarboxilase de *P. putida* e  $\omega$ -transaminase de *V. fluvialis* clonadas em um plasmídeo, ácido 3-(2-metilpropil)-2-oxopentanodioico 0,5 M 400 µL, 10 x ThDP 200 µL (0,1 mM final) e MgSO<sub>4</sub> (2,5 mM final), PLP 50 mM 80 µL (2 mM final), isopropilamina 2 M 300 µL (0,3 M final). Ajustar o pH ao 6,4 e incubar a 45 °C durante 24 horas, depois ajustar o pH ao 6,8 durante um adicional de 24 horas. Uma alíquota (0,5 mL) da reação foi tratada com bicarbonato de sódio aquoso 1 M (0,05 mL) e reagente de Marfey (*N*- $\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)alaninamida, 0,5 mL de solução em acetonitrila 5 g/L) a 40 °C. Depois de 1 h, as reações derivatizadas foram interrompidas com ácido clorídrico aquoso 1 N 0,05 mL. As amostras de reação derivatizadas foram filtradas e analisadas através de UPLC (coluna: coluna Agilent Eclipse Plus C18 (100 mm x 3,0 mm, 1,8 µm) eluídas com ácido trifluoro acético 0,1 % em água:acetonitrila (60:40, v/v) a 1,3 mL/min. A coluna foi mantida a 30 °C e o efluente foi monitorado a 340 nm e espectroscopia de massas ES<sup>+</sup>. A reação forneceu 100 µg/mL de Pregabalina, dos quais 65 % foi o S-isômero desejado.

#### Exemplo 37

Preparação de (S)-Pregabalina via hidrólise de 5-metóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona e transaminação enzimática



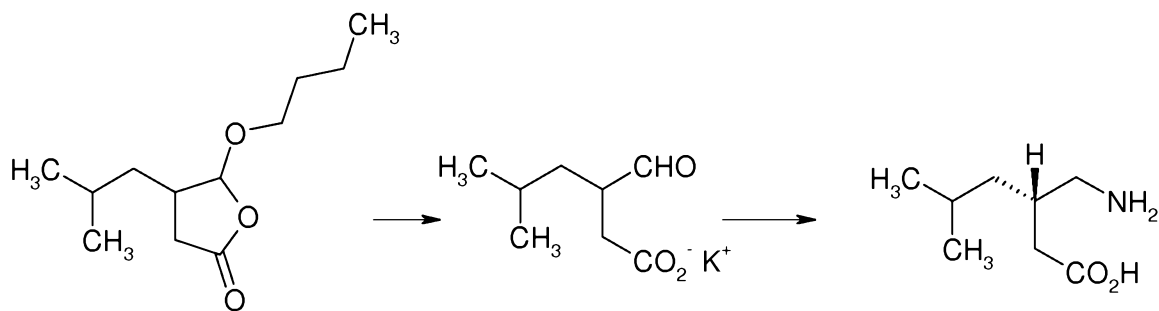
[0339]5-Metóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona (2,58 g, 15 mmols, veja o exemplo 13) foi colocada em suspensão em DIW (5,2 g) e esfriada em um banho de água gelada. KOH aq (50 % p/p, 1,77 g, 1,05 eq) foi adicionado às gotas

via seringa durante 5 min. A reação foi removida a partir do banho de água gelada e agitada na temperatura ambiente durante 90 min. O pH foi ajustado ao 7,0 usando ácido fórmico. A mistura de reação depois foi usada como matéria-prima na reação de transaminase subsequente.

[0340] Solução de enzima transaminase (12,5 g), PLP (35 mg), DIW (15 mL) e solução aquosa de isopropilamina.HCl 4,0 M (7,5 mL, 30 mmols) foram carregados a um frasco de 100 mL e aquecidos a 45 °C. A reação de hidrólise foi adicionada em uma porção, seguido por DIW (6 mL, usado como um enxágue do vaso). O pH da reação foi ajustado ao 7,25 usando isopropilamina pura e a reação foi agitada a 45 °C até a conclusão da reação. A mistura de reação depois foi aquecida a uma temperatura interna de 55 °C e o pH ajustado ao 4,0 usando ácido fórmico 95 %. Carbono Darco (125 mg) foi adicionado e a mistura foi esfriada até a temperatura ambiente antes do esfriamento em água gelada durante 20 minutos. A mistura depois foi filtrada através de papel Whatman nº 3. O filtrado foi concentrado a 1/3 de seu peso e depois aquecido a 55 °C. O pH da solução depois foi ajustado ao pH 7,5 usando KOH 50 %, em seguida, a solução foi esfriada na temperatura ambiente e depois entre 0 a 5 °C em um banho de água gelada. A precipitação do produto foi observado no esfriamento. A pasta fluida foi filtrada e lavada com DIW/EtOH (10 mL, 1:1, 0 °C). O precipitado branco foi seco durante 12 horas em um forno a vácuo (45 °C) para fornecer (S)-Pregabalina em 61 % de rendimento, 98,6 % de p/p pureza e 99.8 % ee (S-isômero preferido).

#### Exemplo 38

Preparação de (S)-Pregabalin via hidrólise de 5-butóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona e transaminação enzimática.



[0341] 5-Butóxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona (3,21 g, 15 mmols, veja o exemplo 13C) foi colocada em suspensão em DIW (8,5 g) e esfriada em um banho de água gelada. KOH aq (50 % p/p, 2,02 g, 1,2 eq) foi adicionado às gotas via seringa durante 5 min. A reação foi removida a partir do banho de água gelada e agitada na temperatura ambiente durante 90 min. O pH da reação depois foi ajustado ao pH 7,0 usando ácido fórmico, e a mistura de reação depois foi usada como matéria-prima na reação de transaminase subsequente.

[0342] Solução de enzima transaminase (12,5 g), PLP (35 mg), DIW (15 mL) e solução de isopropilamina.HCl 4,0 M (7,5 mL, 30 mmols) foram carregados a um frasco de 100mL e aquecidos a 45 °C. A reação de hidrólise (veja acima) foi adicionada em uma porção, seguido por DIW (6 mL, usado como um enxágue do vaso). O pH da reação foi ajustado ao 7,25 usando isopropilamina pura e a reação foi agitada a 45 °C.

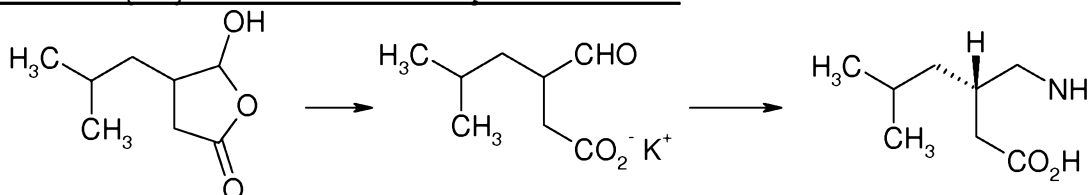
[0343] A mistura de reação foi aquecida a uma temperatura interna de 55 °C e o pH ajustado ao 4,0 usando ácido fórmico 95 %. Carbono Darco (125 mg) foi adicionado e a mistura foi esfriada até a temperatura ambiente antes de ser esfriada em água gelada durante 20 minutos. A mistura depois foi filtrada através de papel Whatman nº 3. O filtrado foi concentrado a 1/3 de seu peso depois aquecido a 55 °C. O pH da solução depois foi ajustado ao pH 7,5 usando KOH 50 %, em seguida, a solução foi esfriada na temperatura ambiente e depois entre 0 a 5 °C em um banho de água gelada. A precipitação do produto foi observado no esfriamento. A pasta fluida foi filtrada e lavada com DIW/EtOH (10 mL, 1:1, 0 °C). O precipitado branco foi seco durante 12 horas em um forno a vácuo (45 °C) para fornecer (S)-Pregabalina



em 51 % de rendimento, 98,4 % p/p de pureza e 99,9 % e.e de S-isômero preferido.

### Exemplo 39

Preparação de (S)-Pregabalin a partir de 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona via transaminação enzimática



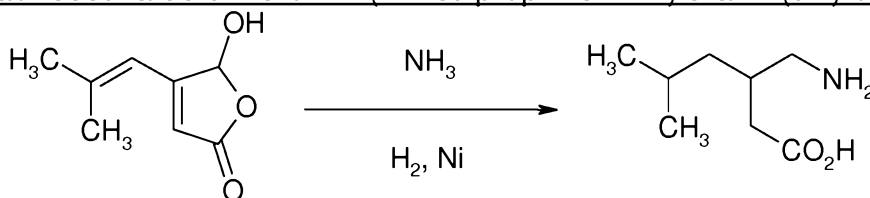
[0344] 5-Hidróxi-4-(2-metilpropil)-di-hidrofuran-2(3H)-ona (2,0 g, 12,5 mmols) foi colocada em suspensão em DIW (8,5 g) e esfriada em um banho de água gelada. Carbonato de potássio (0,863 g, 6,3 mmols) foi adicionado às porções durante o curso de 5 min. A reação foi removida a partir do banho de água gelada e agitada na temperatura ambiente durante 90 min. O pH foi ajustado ao 7,0 usando ácido fórmico e a mistura de reação depois foi usada como matéria-prima na reação de transaminase subsequente.

[0345] Solução de enzima transaminase (10,4 g), PLP (30 mg), DIW (12,5 mL) e solução aquosa de isopropilamina.HCl 4,0 M (6,3 mL, 30 mmols) foram carregados a um frasco de 100 mL e aquecidos a 45 °C. A reação de hidrólise foi adicionada em uma porção, seguido por DIW (5 mL, usado como um enxágue do vaso). O pH da reação foi ajustado ao 7,25 usando isopropilamina pura e a reação foi agitada a 45 °C. A mistura de reação foi aquecida a uma temperatura interna de 55 °C e ajustada ao pH 4,0 usando ácido fórmico 95 %. Carbone Darco (125 mg) foi adicionado e a mistura foi esfriada até a temperatura ambiente antes de ser esfriada em água gelada durante 20 minutos. A mistura depois foi filtrada através de papel Whatman nº 3. O filtrado foi concentrado a 1/3 de seu peso depois aquecido a 55 °C. O pH da solução depois foi ajustado ao pH 7,5 usando KOH 50 %, em seguida, a solução foi esfriada na temperatura ambiente e depois entre 0 a 5 °C em um banho de água gelada. A precipitação do produto foi observada no esfriamento. A pasta

fluida foi filtrada e lavada com DIW/EtOH (10 mL, 1:1, 0 °C). O precipitado branco foi seco durante 12 horas em um forno a vácuo (45 °C) para fornecer (S)-Pregabalina em 61 % de rendimento, 98,3 % p/p de pureza e 99,9 % e.e do S-isômero preferido.

#### Exemplo 40

Preparação de ácido (R/S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico por intermédio de aminação redutiva de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona

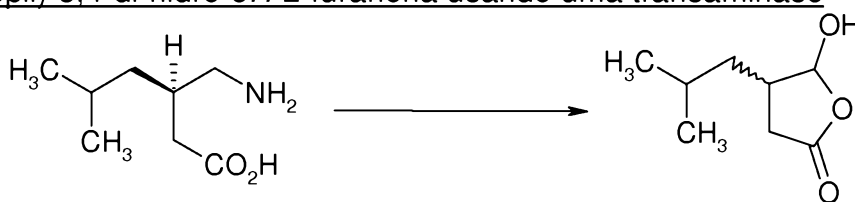


[0346] Uma solução de 5-hidróxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona 0,01 M em solução de amônia aquosa 30 % foi hidrogenada (10 bar, temperatura ambiente) durante 48 h na presença de catalisador de Níquel Raney 10 % em mol. O catalisador foi filtrado e a solução concentrada para deixar um sólido. O produto foi isolado através de adição de ácido clorídrico a uma suspensão de metanol e descoberto ser cloridreto do ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico puro.

[0347] O uso de paládio como um catalisador forneceu misturas de ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico e a amina secundária correspondente, ácido 3-[(2-carboximetil-4-metil-pentilamino)-metil]-5-metil-hexanoico.

#### Exemplo 41

Conversão de ácido R-3-aminometil-5-metil-hexanoico em 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5H-2-furanona usando uma transaminase

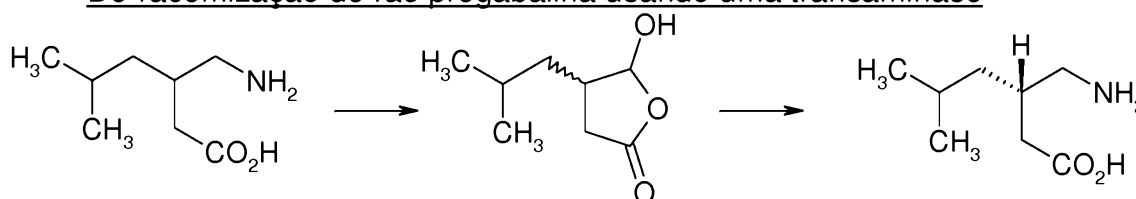


[0348] Uma solução de ácido R-3-aminometil-5-metil-hexanoico em água D.I. ao pH 7,5/45 °C é agitada com um lisato de enzima transaminase, ou preparação celular total contendo fosfato de piridoxal (PLP) e acetona. A isopropilamina

produzida é removida por intermédio de varredura de nitrogênio. A análise da solução depois de 24 h mostrou ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico com um e.e. menor e a presença do composto 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona. A diminuição da pureza quiral da 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona ocorre devido à conversão seletiva de (4*S*)-5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona em S-pregabalina.

#### Exemplo 42

##### De-racemização de *rac*-pregabalina usando uma transaminase



[0349] Uma solução de pregabalina racêmica em DIW ao pH 7,5 é tratada com um lisato de transaminase adequado. PLP é adicionado e a reação progrediu durante 12 h a 45 °C com uma varredura de nitrogênio. Em seguida, isopropilamina é adicionada e a reação é continuada durante um adicional de 12 h. O produto é isolado como no Exemplo 38 para fornecer pregabalina enantiomericamente enriquecida.

[0350] Também é possível efetuar as transformações exemplificadas nos Exemplos 41 e 42 usando um sistema de enzima amina oxidase/imina redutase adequado com um cofator, tal como NADP.

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

##### SEQ ID NO. 1

##### Sequência Genérica de aa de Vfat

[0351] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHX<sup>27</sup>RGTVVVTHGEGPYX<sup>41</sup>VD  
 VX<sup>45</sup>GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLS  
 EKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRX<sup>147</sup>NAYH  
 GVTAVSASMTGX<sup>163</sup>PX<sup>165</sup>NSVFGLPLPGFVHLX<sup>180</sup>CPHYWRYGEEGETEEQFVARL

ARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVIC  
 GFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELX<sup>304</sup>KRLETAIEAIEEF  
 PHGFTAX<sup>324</sup>GHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNIIGEYR  
 GIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSX<sup>401</sup>RIANTCX<sup>408</sup>DLGLICX<sup>415</sup>X<sup>416</sup>X<sup>417</sup>GQSVI  
 LX<sup>424</sup>PPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA

[0352]X<sup>27</sup> é selecionado a partir de glutamina (Q) e ácido glutâmico (E); X<sup>41</sup> é selecionado a partir de isoleucina (I) e valina (V); X<sup>45</sup> é selecionado a partir de asparigina (N) e histidina (H); X<sup>147</sup> é selecionado a partir de asparigina (N) e glutamina (Q); X<sup>163</sup> é selecionado a partir de leucina (L) e metionina (M); X<sup>165</sup> é selecionado a partir de tirosina (Y) e histidina (H); X<sup>180</sup> é selecionado a partir de treonina (T); glicina (G) e serina (S); X<sup>304</sup> é selecionado a partir de alanina (A) e serina (S); X<sup>324</sup> é selecionado a partir de glicina (G) e serina (S); X<sup>401</sup> é selecionado a partir de lisina (K) e ácido glutâmico (E); X<sup>408</sup> é selecionado a partir de treonina (T) e glutamina (Q); X<sup>415</sup> é selecionado a partir de serina (S) e alanina (A); X<sup>416</sup> é selecionado a partir de prolina (P) e alanina (A); X<sup>417</sup> é selecionado a partir de leucina (L) e metionina (M); e X<sup>424</sup> é selecionado a partir de cisteína (C) e serina (S).

## SEQ ID NO. 2

### Sequência de aa de Vfat888

[0353]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVN  
 GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
 VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTA  
 VSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
 EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
 GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPV  
 GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNIIGEYRGIGFMWALEAVK  
 DKASKTPFDGNLSVSERIANCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
 ALDKVFAEVA

SEQ ID NO. 3Sequência de aa de Vfat906

[0354]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTA  
VSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIIS SKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
ALDKVFAEVA

SEQ ID NO. 4Sequência de aa de Vfat999

[0355]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIIS SKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEK  
ALDKVFAEVA

SEQ ID NO. 5Sequência de aa de Vfat1010

[0356]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA

VSASMTGMPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQ  
REGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNT  
WGCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGH  
PVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEA  
VKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDK  
LEKALDKVFAEVA

SEQ ID NO. 6

Sequência de aa de Vfat1020

[0357]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVV VTHGEGPYVVDVN  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLE  
KALDKVFAEVA

SEQ ID NO. 7

Sequência de aa de Vfat1030

[0358]MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVV VTHGEGPYIVDVH  
GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKL  
VEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTA  
VSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQR  
EGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTW  
GCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPV  
GCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK  
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLE

KALDKVFAEVA

SEQ ID NO. 8

Sequência de proteína de 12-Oxofitodienoato Redutase 1 de *Lycopersicon esculentum* (tomate):

[0359]MENKVVEEKQVDKIPLMSPCKMGKFELCHRVVLAPLTRQRSYGYIP  
QPHAILHYSQRSTNGLLIGEATVISETGIGYKDVPGIWTKEQVEAWKPIVDAVHAK  
GGIFFCQIWHVGRVSNKDFQPNGEDPISCTDRGLTPQIRSNIDIAHFTRPRRLTTD  
EIPQIVNEFRVAARNAIEAGFDGVEIHGAHGYLIDQFMKDQVNDRSDKYGGSLENRC  
RFALEIVEAVANEIGSDRVGIRISPFAYHNEAGDTNPTALGLYMVESLNKYDLAYCHV  
VEPRMKTAWEKIECTESLVPMRKAYKGTFIVAGGYDREDGNRALIEDRADLVAYGR  
LFISNPDLPKRFELNAPLNKYNRDTFYTSDPIVGYTDYPFLETMT

SEQ ID NO. 9

Sequência otimizada no códon de 12-Oxofitodienoato Redutase 1 de *Lycopersicon esculentum* (tomate):

[0360]ATGGAAAACAAAGTTGTGGAAGAAAAACAGGTTGATAAAATCCCG  
CTGATGAGCCCGTGTAATGTTGTTAAATTCGAGCTGTGTCATCGCGTTGTACTG  
GCACCGCTGACTCGTCAGCGTTCTTATGGTTACATTCCGCAGCCGCACGCAATC  
CTGCATTACTCTCAGCGCAGCACCAACGGTGGCCTGCTGATCGGTGAAGCAAC  
CGTGATCAGCGAAACTGGCATCGGTTACAAAGATGTGCCGGGTATCTGGACGA  
AAGAGCAGGTTGAGGCCTGGAAACCGATCGTCGACGCGGTGCATGCCAAAGGT  
GGTATTTTCTTTTGTGATCTGGCACGTTGGTCGTGTATCCAACAAAGATTTTC  
AGCCGAACGGCGAAGATCCGATTTCTGTACTGACCGCGGCCTGACCCCGCAG  
ATCCGTTCCAACGGCATTGACATTGCCCACTTCACCCGTCCACGTCGCCTGACT  
ACTGACGAGATTCCGCAGATCGTGAACGAGTTCCGCGTTGCAGCGCGTAATGC  
TATTGAAGCGGGTTTCGATGGCGTCGAGATTCATGGTGCCACGGTTACCTGAT  
CGACCAATTCATGAAAGACCAAGTTAACGACCGCAGCGATAAGTATGGCGGTTC  
TCTGGAGAACCGTTGTGCTTCGCGCTGGAAATCGTTGAAGCAGTAGCCAACG

AGATTGGCTCCGACCGTGTTGGTATCCGTATCTCTCCATTGCGACACTACAACG  
AAGCGGGCGACACTAACCCGACCGCACTGGGCCTGTATATGGTGGAGAGCCTG  
AATAAATACGACCTGGCGTATTGTCACGTGGTTCGAGCCGCGCATGAAAACCGC  
CTGGGAAAAGATTGAGTGCACCGAAAGCCTGGTGCCGATGCGTAAAGCCTACA  
AAGGCACCTTCATCGTAGCTGGTGGCTACGACCGTGAAGACGGTAACCGCGCT  
CTGATCGAAGACCGTGCCGACCTGGTTGCGTACGGTCGTCTGTTTCATCAGCAA  
CCCAGACCTGCCGAAGCGTTTTGAACTGAACGCTCCGCTGAACAAATACAACCG  
TGACACTTTCTACACTTCCGACCCGATCGTTGGTTACACCGATTACCCGTTTCTG  
GAAACTATGACTTAATAA

SEQ ID NO. 10

SEQUÊNCIA de DNA de Vfat 888

[0361]ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACCAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAAATCCTGACTCGTAACAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGTTTCCGCT  
TCCATGACGGGTCTGCCGTACAACTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTT  
CGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG  
AAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGT  
GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG  
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT  
ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC



TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
CCGGAACTGGCGAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
GCACGGCTTTACGGCCAGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG  
CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
TAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCGAGCGTATCGCTAACACCTG  
TACCGACCTGGGCCTGATCTGTAGCCCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGTGCC  
CGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAG  
AAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

SEQ ID NO. 11

SEQUÊNCIA de DNA de Vfat 906

[0362]ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAATCCTGACTCGTAACAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGTTTCCGCT  
TCCATGACGGGTCTGCCGTACAACTCTGTATTCCGCCTGCCGCTGCCGGGTTT  
CGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG  
AAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGT  
GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG  
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT

ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC  
TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
CCGGAACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
GCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG  
CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
TAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGT  
CAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGTGCCC  
GCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAA  
GGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

SEQ ID NO. 12

SEQUÊNCIA de DNA de Vfat 999

[0363]ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGG  
ACGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTG  
ATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTC  
GGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCT  
CCATTCGACAGCGGTCGCGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGAT  
ACTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAA  
ACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAACCTGCTGTTTCCGC  
TTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCCGGCCTGCCGCTGCCGGGTT  
TCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACC  
GAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACG  
TGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCG  
GGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCT

GCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCC  
TACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCAT  
CTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGG  
TCCGGAACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCC  
CGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAA  
GCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGC  
ACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTG  
AATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCAT  
CTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCT  
GTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGC  
CCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

SEQ ID NO. 13

SEQUÊNCIA de DNA de Vfat 1010

[0364]ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTCGCGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAACCTGCTGTTTCCGCT  
TCCATGACGGGTATGCCGCACAACTCTGTATTCCGCCTGCCGCTGCCGGGTTT  
CGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG  
AAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAAACTATCCAACGT  
GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG

GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT  
ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC  
TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
CCGGCACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
GCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG  
CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
TAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGT  
CAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCC  
GCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAA  
GGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

SEQ ID NO. 14

SEQUÊNCIA de DNA de Vfat 1020

[0365]ATGAATAAACCAACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGG  
ACGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTG  
ATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTC  
GGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAAACTGGTAGAGGTGTCT  
CCATTCGACAGCGGTCGCGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGAT  
ACTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAA  
ACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAACCTGCTGTTTCCGC  
TTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTT  
TCGTTACCTGGGTTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACC  
GAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAAACTATCCAACG

TGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCG  
GGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCT  
GCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCG  
TACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCAT  
CTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGG  
TCCGGAAGTGAAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCC  
CGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAA  
GCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGC  
ACCGCGTTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTG  
AATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCAT  
CTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCT  
GTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGC  
CCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

SEQ ID NO. 15

SEQUÊNCIA de DNA de Vfat 1030

[0366]ATGAATAAACCAACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCT  
CTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTC  
ACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCCACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGAT  
CGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCG  
GTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTC  
CATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATA  
CTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAA  
CGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAGTCTGTTTCCGCT  
TCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCCGCCTGCCGCTGCCGGGTTT  
CGTTCACCTGAGCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCG

AAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGGAGGAACTATCCAACGT  
GAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG  
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTG  
CGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGT  
ACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC  
TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGT  
CCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCC  
GCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAG  
CAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCA  
CCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGA  
ATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATC  
TAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGT  
CAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCC  
GCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAA  
GGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

### REIVINDICAÇÕES

1. Enzima transaminase **CARACTERIZADA** pelo fato de que apresenta a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1:

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHX<sup>27</sup>RGTVVVTHGEGPYX<sup>41</sup>VDVX<sup>45</sup>G  
 RRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLV  
 EVSPFDSGRVFTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRX<sup>147</sup>NAYHGVT  
 VSASMTGX<sup>163</sup>PX<sup>165</sup>NSVFGLPLPGFVHLX<sup>180</sup>CPHYWRYGEEGETEEQFVARLAREL  
 EETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGFR  
 TGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTAGFFPVGAVILGPELX<sup>304</sup>KRLETAIEAIEEFPHGF  
 TAX<sup>324</sup>GHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF  
 MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSX<sup>401</sup>RIANTCX<sup>408</sup>DLGLICX<sup>415</sup>X<sup>416</sup>X<sup>417</sup>GQSVILX<sup>424</sup>  
 PPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 1),

em que:

X<sup>27</sup> é selecionado a partir de glutamina (Q) e ácido glutâmico (E);

X<sup>41</sup> é selecionado a partir de isoleucina (I) e valina (V);

X<sup>45</sup> é selecionado a partir de asparigina (N) e histidina (H);

X<sup>147</sup> é selecionado a partir de asparigina (N) e glutamina (Q);

X<sup>163</sup> é selecionado a partir de leucina (L) e metionina (M);

X<sup>165</sup> é selecionado a partir de tirosina (Y) e histidina (H);

X<sup>180</sup> é selecionado a partir de treonina (T); glicina (G) e serina (S);

X<sup>304</sup> é selecionado a partir de alanina (A) e serina (S);

X<sup>324</sup> é selecionado a partir de glicina (G) e serina (S);

X<sup>401</sup> é selecionado a partir de lisina (K) e ácido glutâmico (E);

X<sup>408</sup> é selecionado a partir de treonina (T) e glutamina (Q);

X<sup>415</sup> é selecionado a partir de serina (S) e alanina (A);

X<sup>416</sup> é selecionado a partir de prolina (P) e alanina (A);

X<sup>417</sup> é selecionado a partir de leucina (L) e metionina (M); e

X<sup>424</sup> é selecionado a partir de cisteína (C) e serina (S).

2. Enzima transaminase, de acordo com a reivindicação 1,

**CARACTERIZADA** pelo fato de que:

X<sup>27</sup> é ácido glutâmico (E);

X<sup>147</sup> é glutamina (Q);

X<sup>165</sup> é histidina (H);

X<sup>304</sup> é serina (S);

X<sup>324</sup> é glicina (G);

X<sup>401</sup> é lisina (K);

X<sup>408</sup> é glutamina (Q);

X<sup>416</sup> é alanina (A);

X<sup>417</sup> é metionina (M); e

X<sup>424</sup> é serina (S).

3. Enzima transaminase, de acordo com a reivindicação 1,

**CARACTERIZADA** pelo fato de que apresenta uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de:

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRY  
LDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVS  
PFDSGRVIFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTAVSAS  
MTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGAD  
TIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVT  
YDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCAIA  
LKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASK  
TPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKV  
FAEVA (SEQ ID NO. 2);

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYL  
DANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSP



FDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTAVSASM  
 TGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTI  
 AGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYD  
 FTPDAIISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALK  
 AIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVKDKASKTP  
 FDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFA  
 EVA (SEQ ID NO. 3);

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRY  
 LDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVS  
 PFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSAS  
 MTGLPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGAD  
 TIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVT  
 YDFTPDAIISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAI  
 ALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVKDKAS  
 KTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDK  
 VFAEVA (SEQ ID NO. 4);

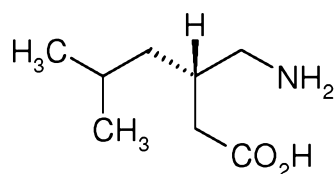
MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYL  
 DANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSP  
 FDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASM  
 TGMPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGAD  
 TIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVT  
 YDFTPDAIISSKNLTAGFFPVGAVILGPALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAI  
 ALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVKDKAS  
 KTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDK  
 VFAEVA (SEQ ID NO. 5);

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRY  
 LDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVS

PFDSGRV FYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSAS  
 MTGLPHNSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGA  
 DTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCV  
 TYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCA  
 IALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVKDKAS  
 KTFPDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDK  
 VFAEVA (SEQ ID NO. 6); e

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVHGRRYL  
 DANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSP  
 FDSGRV FYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASM  
 TGLPHNSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADT  
 IAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTY  
 DFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIAL  
 KAIDVVMNEGLAENVRR LAPRFEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVKDKASKT  
 PFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVF  
 AEVA (SEQ ID NO. 7).

4. Processo para a fabricação de ácido (*S*)-3-aminometil-5-metil-hexanoico  
 ((*S*)-II)



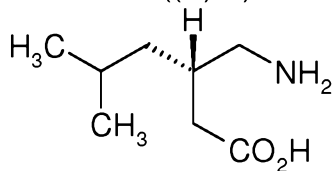
((*S*)-II)

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a etapa de tratar 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) e uma amina com uma enzima transaminase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

## RESUMO

“ENZIMA TRANSAMINASE E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE  
ÁCIDO (S)-3-AMINOMETIL-5-METIL-HEXANOICO”

A presente invenção se refere a uma enzima transaminase que apresenta a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1 e a um processo para a fabricação de ácido (S)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II)



((S)-II)

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, em que o dito processo compreende a etapa de tratar 5-hidróxi-4-(2-metilpropil)-3,4-di-hidro-5*H*-2-furanona (I<sup>A</sup>) e uma amina com a dita enzima transaminase.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

#### Campo 1



A8965135A98520A0

#### Campo 2



151E414B07C4DFB7

### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 172955-1 Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 24-03-2017
- Hora de Geração do Código: 11:18:53
- Código de Controle:
  - Campo 1: A8965135A98520A0
  - Campo 2: 151E414B07C4DFB7