

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12P 19/02, 7/60, C12N 9/88 // C07H 3/02, 3/08, 7/027	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/18640 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1992 (29.10.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/00781 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 1992 (07.04.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 11 971.1 12. April 1991 (12.04.91) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstrasse 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FESSNER, Wolf-Dieter [DE/DE]; Bundesstrasse 130, D-7803 Gundelfingen (DE). (74) Anwälte: WEBER, Manfred usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Straße 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: ENZYMATIC METHOD FOR PREPARING ENANTIOMER- AND DIASTERIOMER-PURE KETOSES AND THEIR 1-ORTHOPHOSPHATE ESTERS (54) Bezeichnung: ENZYMATISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG ENANTIO- UND DIASTEREOMERENREINER KETOSEN UND DEREN 1-ORTHOPHOSPHATESTER (57) Abstract The invention concerns a method for preparing enantiomer- and diastereomer-pure ketoses by reacting aldehydes with dihydroxyacetone phosphate in the presence of an enzyme in aqueous medium and subsequent hydrolysis, characterized in that the ketose-1-phosphates to be derived from the aldehydes can be obtained in all four absolute configurations as desired, depending on the enzymes used, namely fructose-1,6-diphosphate aldolase ([EC 4.1.2.13]; D-threo- = (3S, 4R) configuration), tagatose-1,6-diphosphate aldolase (not yet classified; L-erythro- = (3S, 4S) configuration), fucose-1-phosphate aldolase ([EC 4.1.2.17]; D-erythro- = (3R, 4R) configuration) or rhamnose-1-phosphate aldolase ([EC 4.1.2.19]; L-threo- = (3R, 4S) configuration). (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung enantio- und diastereomerenreiner Ketosen durch Umsetzung von Aldehyden mit Dihydroxyacetonphosphat in Gegenwart eines Enzyms in wässrigem Milieu und nachfolgende Hydrolyse, dadurch gekennzeichnet, dass die von den Aldehyden abzuleitende Ketose-1-phosphate aller vier absoluten Konfigurationen gezielt in Abhängigkeit der eingesetzten Enzyme - Fructose-1,6-diphosphataldolase ([EC 4.1.2.13]; D-threo- = (3S, 4R)-Konfiguration), Tagatose-1,6-diphosphataldolase (noch nicht klassifiziert; L-erythro- = (3S, 4S)-Konfiguration), Fucose-1-phosphataldolase ([EC 4.1.2.17]; D-erythro- = (3R, 4R)-Konfiguration) bzw. Rhamnose-1-phosphataldolase ([EC 4.1.2.19]; L-threo- = (3R, 4S)-Konfiguration) - erhalten werden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

Enzymatisches Verfahren zur Herstellung enantio- und diastereomerenreiner Ketosen und deren 1-Orthophosphatester
Die Erfindung beschreibt ein generelles Verfahren zur Herstellung enantio- und diastereomerenreiner Ketosen durch enzymatische Umsetzung von Aldehyden mit Dihydroxyacetonphosphat in Gegenwart von wahlweise vier verschiedenen Aldolasen. Diese Produkte und ihre Derivate interessieren als niederkalorige Süßstoffe, als Komponenten oder Vorstufen pharmazeutischer Wirkstoffe wie Antibiotika oder Glykosidase-Inhibitoren.

Aus der PCT/US82/00534 (WO 83/03846) ist bereits ein Verfahren zur Herstellung von 6-Desoxy-D-fructose und 6-Desoxy-L-sorbose bekannt, bei dem D- und/oder L-Lactaldehyd in Gegenwart kommerzieller Kaninchenmuskelaldolase mit Dihydroxyacetonphosphat oder D-Fructose-1,6-diphosphat und Triosephosphatisomerase bei pH 7 zur Reaktion gebracht wird. Die Nachteile dieses Verfahrens sind die Beschränkung auf eine einzige Form diastereomeren Produkts, nämlich derjenigen mit der absoluten D-threo-(3S,4R)-Konfiguration, und der Instabilität der Reaktionskomponente Dihydroxyacetonphosphat bei neutralem oder alkalischem pH. Letztere weist jedoch eine signifikant höhere Stabilität in saurem Milieu auf (u. a. J. P. Richard, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 4926-36).

Aus mehreren Quellen ist bekannt (u. a. G. M. Whitesides et al., J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 627-35), daß dieselbe Kaninchenmuskelaldolase (eine Aldolase der Klasse 1, die eine kovalente Bindung zur Substrataktivierung erfordert) ein breites Spektrum von Aldehyden umsetzen kann. Die Diastereoselektivität der Addition ist jedoch nur für wenige Beispiele gesichert worden; die Reinheit und chemischen Ausbeuten der Produkte, sowie die Stabilität des Enzyms unter den

Reaktionsbedingungen zeigen allerdings einige Mängel. Eine aus Staphylokokken isolierte D-Tagatose-1,6-diphosphat-aldolase (Klasse 1) ist darüber hinaus als stereochemisch völlig unselektiv beschrieben worden (D. L. Bissett und R. L. Anderson, J. Biol. Chem. 255 (1980) 8750-55). Die Verwendung der D-Fructose-1,6-diphosphataldolase aus *Escherichia coli* (eine Aldolase der Klasse 2, die das Substrat ohne kovalente Bindung aktiviert) ist nur an drei eng verwandten Beispielen belegt (von der Osten et al., J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 3924-27), über das mögliche weitere Einsatzspektrum und insbesondere über die Stereoselektivität ist jedoch nichts Näheres bekannt; auch hier waren die Ausbeuten zum Teil mangelhaft. Die Verwendung der L-Fuculose-1-phosphataldolase aus *Escherichia coli* ist an einem wenig ergiebigen Beispiel demonstriert (Ausbeute 42 %, optische Reinheit ca. 90 %), eventuelle weitere Einsatzmöglichkeiten jedoch nur anhand indirekter enzymatischer Assays mit wenigen Substratanaloga nahegelegt worden (A. Ozaki et al., J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 4970-71). Generell werden derartige Reaktionen bei neutralem pH (7.0) durchgeführt.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein breit anwendbares enzymatisches Verfahren vorzuschlagen, mit dem alle vier möglichen Diastereomere unter milden Reaktionsbedingungen hoch diastereoselektiv und damit in hoher chemischer und optischer Reinheit hergestellt werden können.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß aus Aldehyden in Gegenwart von Dihydroxyacetonphosphat in wässriger Lösung von schwach saurem pH durch bestimmte, bekannte Enzyme gezielt enantio- und diastereomerenreine, auf den eingesetzten Aldehyden basierende Ketose-1-phosphate bestimmter Konfiguration in besonders hoher chemischen Reinheit und besonders hohen präparativen Ausbeuten herstellbar sind. Dementsprechend betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung enantio- und diastereomerenreiner Ketosen durch Umsetzung von Aldehyden mit Dihydroxyacetonphosphat in Gegenwart eines Enzyms in wässrigem Medium und nachfolgende Hydrolyse, dadurch gekennzeichnet, daß die von den Aldehyden abzuleitende Ketose-1-phosphate aller vier absoluten Konfigurationen gezielt in Abhängigkeit der eingesetzten Enzyme-D-Fructose-1,6-diphosphataldolase ([EC 4.1.2.13]; D-threo = (3S, 4R)-Konfiguration), D-Tagatose-1,6-diphosphataldolase (noch nicht klassifiziert; L-erythro- = (3S, 4S)-Konfiguration), L-Fuculose-1-phosphataldolase [EC 4.1.2.17]; D-erythro- = (3R, 4R)-Konfiguration) bzw. L-Rhamnulose-1-phosphataldolase ([EC 4.1.2.19]; L-threo = (3R, 4S)-Konfiguration - erhalten werden.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die jeweiligen Ketose-1-phosphate in wässrigem Milieu bei einem derartigen pH-Wert hergestellt, daß ausreichende Stabilität insbesondere der zweiten Reaktionskomponente Dihydroxyacetonphosphat und hohe enzymatisch katalysierte Reaktionsgeschwindigkeit unter Erhalt der typischen Diastereoselektivität garantiert werden.

Geeignete Verfahren zur Herstellung auch größerer Mengen an Dihydroxyacetonphosphat sind bekannt (F. Effenberger und A. Straub, Tetrahedron Lett. 28 (1987) 1641-44; R. L. Pederson et al., Tetrahedron 47 (1991) 2643-49).

Die aus *Escherichia coli* (z. B. Wildtyp K-12 (DSM 498) oder Varianten Crooke's Strain (DSM 1576; ATCC 8739), Strain B (DSM 613; ATCC 11303) bzw. Strain 0111-B4 (ATCC 12015); Bezugsquellen: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig, oder American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852-1776, USA oder International Enterobacteriaceae Center, Kopenhagen, Dänemark) stammenden Enzyme, ihre Diastereopräferenz und Verfahren zu ihrer Isolierung sind u. a. aus den folgenden Arbeiten bekannt:

Fructose-1,6-diphosphataldolase: S. a. Baldwin et al., Biochem. J. 169 (1978) 633-641; Tagatose-1,6-diphosphataldolase: J. Lengeler, Mol. Gen. Genet. 152 (1977) 83-91; Fuculose-1-phosphataldolase: M. A. Ghalambor und E. C. Heath, J. Biol. Chem. 237 (1962) 2427-33; Rhamnulose-1-phosphataldolase: T.-H. Chiu und D. S. Feingold, Biochemistry 8 (1969) 98-108; jedoch ist ihre Brauchbarkeit für eine breit variierte Gewinnung diastereomerenreiner Ketosen und deren Derivate nicht dokumentiert.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die strukturell und mechanistisch im Vergleich zur Kaninchenmuskelaldolase andersartigen Aldolasen der Klasse 2 eine Vielzahl unterschiedlicher Aldehyde in vergleichbarem Maß als alternative Substrate umsetzen. Ebenso überraschend war der Befund, daß die Aktivität aller vier beschriebenen Aldolasen im Hinblick auf die Synthese von Ketose-1-phosphaten bei schwach saurem pH-Wert (6.0 bis 6.9) zwar etwas vermindert, aber für präparative Zwecke noch ausreichend ist und daß die jeweils charakteristische Diastereoselektivität unter diesen Bedingungen voll erhalten bleibt. Der optimale pH-Bereich wird mit von der Stabilität der aldehydischen Substrate bestimmt, liegt aber vorzugsweise bei pH 6.4 bis 6.7.

Das wäßrige Milieu kann dabei gegebenenfalls zur Verbesserung der Löslichkeit lipophiler Aldehyde bis maximal 50 Vol.% organisches Cosolvens wie niedere aliphatische Alkohole (Methanol, Ethanol, n- oder i-Propanol), Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid oder Acetonitril enthalten. Da die Enzymaktivität jedoch durch die Anwesenheit organischer Lösungsmittel vermindert wird, sollte vorzugsweise ohne (0 %), falls erforderlich aber bis maximal 30 Vol.% Cosolvens gearbeitet werden.

Die Stabilität der Enzyme in wässriger Lösung kann gegebenenfalls durch Zusatz geringer Mengen (Konzentrationen bis zu 1 mM) an Schwermetallsalzen wie Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} oder Mn^{2+} -Acetat oder -Formiat erhöht werden. Höhere Konzentrationen können zur Fällung von Phosphaten führen. Andere Anionen (z. B. Chlorid, Bromid, Sulfat) sind zwar ebenfalls mit der Enzymaktivität verträglich, können aber zur Verunreinigung der Produkte führen. Vorzugsweise wird Zink- oder Kobaltacetat in einer Konzentration von 0.4 bis 0.5 mM verwendet. Eine meßbare Aktivitätssteigerung wird auch durch Zusatz von Alkalimetallionen, vorzugsweise K^+ (z. B. als KOAc) erreicht. Um der Enzyminaktivierung durch Oxidation vorzubeugen, wird vorteilhaft unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff, Argon), in entgastem Lösungsmittel (Wasser, Cosolvens) und/oder unter Zusatz von Thiolen (z. B. Mercaptoethanol, Cystein, Glutathion; 0.5 bis 10 mM) gearbeitet. Der Einsatz löslicher Enzyme erleichtert die Dosierung und Bestimmung der Restaktivitäten, jedoch kann eine Immobilisierung an feste Träger, z. B. an Eupergit[®] C, die Stabilität der vier obengenannten Enzyme ebenfalls vorteilhaft erhöhen.

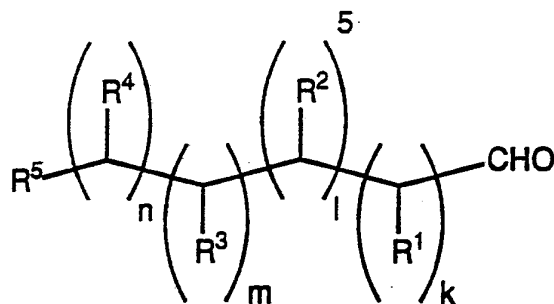
Die Reaktionstemperatur kann zwischen - 5°C und 40 °C variiert werden, zur Wahrung hoher Umsatzgeschwindigkeit bei hinreichender Enzym- und Substratstabilität wird im allgemeinen bei 25 °C bis 30 °C gearbeitet.

In Kauf genommen wird bei der erfindungsgemäßen Reaktion, daß sich die enzymatische Aktivität und die Haltbarkeit der Enzyme mit abnehmendem pH-Wert vermindern, jedoch sind die vier obengenannten Enzyme aus natürlich vorkommend induzierbaren oder konstitutiven Bakterien-Stämmen, insbesondere aber aus molekularbiologisch erzeugten Überexperimenten gut zugänglich (u. a. P. R. Alefounder et al., Biochem. J. 257 (1989) 529-534; E. C. C. Lin et al., J. Bacteriol. 171 (1989) 6097-6105; J. Badia et al., FEMS Microbiol. Lett. 65 (1989) 253-58), so daß der Einsatz erhöhter Mengen und eine Nachdosierung problemlos sind.

Gemäß der Erfindung können als Substrate alle substituierten oder unsubstituierten aliphatischen (Typ A oder B), heteroaromatischen (Typ C) und heterocyclischen (Typ D) Aldehyde, die Substrate für die Aldolasen sind, in deren Gegenwart mit Dihydroxyacetonphosphat zu diastereomerenreinen Ketose-1-phosphaten gezielt wählbarer absoluter Konfiguration umgesetzt werden. Ein besonderes Interesse gilt (teil-)hydroxylierten aliphatischen Aldehyden im Hinblick auf die Verwendung der Ketoseprodukte bzw. ihrer Derivate im pharmazeutischen Bereich. Beispiele sind für den Typ A bzw. B zum Beispiel Acet-, Propion-, n- oder i-Butyraldehyd, Hydrozimt-, Hydratrop-, oder Phenylacetaldehyd, Glykol-, 3-Hydroxypropion-, 3-Hydroxy-2-methylpropion, 3- bzw. 4-Hydroxybutyr-, 3-Oxobutyr- oder 3,3-Diethoxypropionaldehyd, Glyoxylsäure oder Bernsteinsäuresemialdehyd, sowie Thioacet-, Chloracet-, Bromacet-, Acetylaminoacet-, Dimethylaminoacet- bzw. -propion oder -butyraldehyd, enantiomerenreine Glycerin-, Lact- oder Weinsäuresemialdehyde, C₄- bis C₆-Monosaccharide und speziell deren 2-Desoxyderivate wie 2-Desoxytetrose, -ribose, -glucose

oder -galactose; für den Typ C Pyridin-, Pyrazin-, Pyrazol-, Imidazol- oder Pyrrolcarbaldehyd; für den Typ D Tetrahydrofurfural, Thiazolidin- oder Oxazolidincarbaldehyd, sowie Aceton- oder Formaldehydacetale des Glycerin- oder Dihydroxybutyraldehyds.

Die Produkte können vorteilhaft durch Fällung als Bariumsalze, Absorption an Anionenaustauschern und/oder Kristallisation als Cyclohexalammonium-, (Di(cyclohexyl)ammonium- oder Lithiumsalze isoliert werden. Durch bekannte Verfahren zur Hydrolyse der Phosphatester werden die freien Ketosen bzw. -derivate erhalten. Vorzugsweise findet dabei die enzymatische Hydrolyse durch saure oder alkalische Phosphatase im pH-Bereich von 5 bis 7 bzw. 8 bis 9 und bei Temperaturen zwischen 25 bis 30 °C Verwendung, da chemische Hydrolyse drastischere Bedingungen (niedrigeren oder höheren pH, höhere Temperaturen) erfordert, was zu teilweiser Zersetzung oder Isomerisierung der Produkte führt.



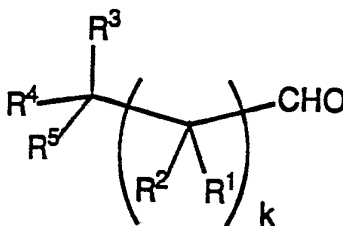
Typ A

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 unabhängig voneinander = H, CH_3 , CH_2CH_3 , Phenyl, Halogen, OH, OR^7 , OR^8 , SH, SR^7 , NH_2 , NHR^7 , NHR^8 , NR^7_2 , N_3 , $=\text{O}$, $=\text{NH}$, $=\text{NR}^7$, CH_2OH , CH_2OR^7 , CH_2OR^8 , CHO, COCH_3 , COOH, COOR^7 , CONH_2 ,

$R^7 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{Benzyl}$

$R^8 = \text{COCH}_3$

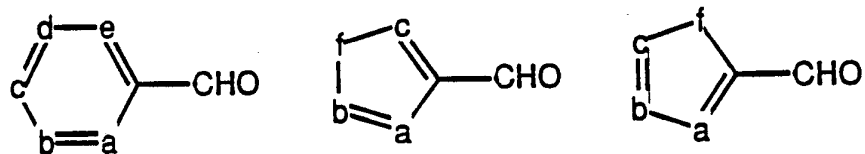
k, l, m, n unabhängig voneinander = 0, 1 oder 2



Typ B

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 unabhängig voneinander = H, CH_3 , CH_2CH_3

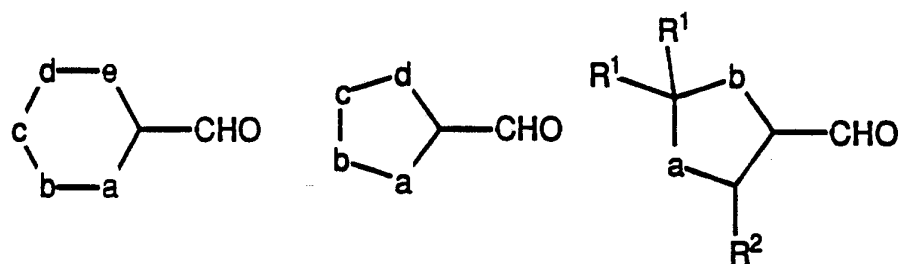
$k = 0, 1, 2$ oder 3



Typ C

a, b, c, d, e unabhängig voneinander = N oder CH

f = NH, O, S oder CH₂



Typ D

a, b, c, d, e unabhängig voneinander = N, O, S oder CH₂

R¹ = H oder CH₃ R² = H, CH₃, CH₂OH, CHO, CH₂OAlkyl, COOH, COOAlkyl

Nachfolgende Beispiele sollen die verschiedenen Aspekte der Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

Eine wässrige Lösung von Dihydroxyacetonphosphorsäure (4 mmol in 40 ml) wurde mit Kalilauge auf pH 6.5 eingestellt und mit einer Lösung von L-Glycerinaldehyd (5 mmol in 60 ml) vereinigt. Nach Zugabe von 11 mg Zinkacetat (0.5 mM) und 50 mg Kaliumacetat (5 mM) wurde im Vakuum entgast. Danach wurden 35 µl Mercaptoethanol (5 mM) und 200 µl einer wässrigen Lösung von Fuculose-1-phosphataldolase (ca. 20 U) zugegeben und unter Stickstoffatmosphäre auf 25 °C temperiert. Die Reaktion wurde mittels enzymatischem Assay auf Dihydroxyacetonphosphat (H. U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis, 3. Auflage; Academic Press, New York, 1984; Band 6, S. 342) verfolgt. nach 20 h war alles Dihydroxyacetonphosphat verbraucht und im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel; Iso-propanol/Ammoniak/Wasser &:4:2) war ein neuer Fleck entstanden. Das Produkt wurde an einer Säule mit Sowex 1-X8 (Hydrogencarbonat-Form, 20 ml) gebunden und durch Elution mit Triethylammonium-Hydrogencarbot-Puffer (200 mM) isoliert. Nach Ionenaustausch (Dowex 50W-X8, H⁺) wurde mit Cyclohexylamin neutralisiert und aus 95 % Ethanol als Bis(cyclohexylammonium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 1.58 g (86 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 % (bestimmt durch ¹H-NMR bei 400 MHz).

Zur Esterhydrolyse wurde die saure Produktlösung (nach Ionenaustausch, vor der Neutralisation) auf 150 ml verdünnt und auf pH 6.0 eingestellt. Nach Zugabe von saurer Phosphatase (5 mg, ca. 250 U) wurde bei 25 °C stehen gelassen und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 48 h war die Reaktion beendet, die Lösung wurde entsalzt (Dowex W50-X8/H⁺ und 1-X8/OH⁻) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurde der Rückstand, bestehend aus L-Tagatose, aus Ethanol kristallisiert. Chemische Ausbeute: 570 mg (92 % d. Th.).

Beispiel 2

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (1 mmol) mit Bernsteinsäuresemialdehyd (2 Äquivv.) in Gegenwart von Fucose-1-phosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 24 h beendet. Das Produkt wurde durch Elution mit Ameisensäure/Formiat-Puffer (1.5 M, pH 2) isoliert und als Tris(Lithium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 233 mg (80 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an 2,3-Didesoxy-D-erythro-6-heptulosonäsure: 146 mg (95 % d. Th.).

Beispiel 3

Entsprechend Beispiel 1, aber bei pH 6.0, wurde Dihydroxyacetonphosphat (1 mmol) mit Pyridin-2-carbaldehyd (1.5 Äquivv.) in Gegenwart von Fucose-1-phosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 18 h beendet. Das Produkt wurde als Bis(dicyclohexylammonium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 386 mg (84 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an 4-(2-Pyridyl)-4-desoxy-L-erythro-tetralose: 146 mg (88 % d. Th.).

Beispiel 4

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (1 mmol) mit Glykolaldehyd (1.2 Äquivv.) in Gegenwart von Tagatose-1,6-diphosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 12 h beendet. Das Produkt wurde durch Elution mit Triethylammonium-Hydrogencarbonat-Puffer (200 mM) isoliert und als Bis(cyclohexalammonium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 368 mg (86 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an L-erythro-pentulose (L-Ribulose): 118 mg (91 % d. Th.).

Beispiel 5

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (5 mmol) mit L-Lactaldehyd in Gegenwart von Rhamnulose-1-phosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 7 h beendet. Zur Isolierung des Produkts wurde die Reaktionsmischung direkt mit Dowex 50W-X8/H⁺ (15 mL) angesäuert, mit Cyclohexalamin neutralisiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde aus 95 % Ethanol zum Bis(cyclohexylammonium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 2215 mg (95 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an 6-Desoxy-L-arabino-hexulose (L-Rhamnulose): 725 mg (93 % d. Th.):

Beispiel 6

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (1 mmol) mit iso-Butyraldehyd in Gegenwart von Rhamnulose-1-phosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 20 h beendet. Das Produkt wurde als Bis(cyclohexylammonium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 532 mg (88 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an 5,6-Didesoxy-5-methyl-L-Threo-hexulose: 117 mg (91 % d. Th.).

Beispiel 7

Eine wässrige Lösung von Dihydroxyacetonphosphorsäure (1 mmol in 30 ml) wurde mit Kalilauge auf pH 6.5 eingestellt, 9 mg Zinkacetat (0.5 mM) und eine Lösung von Hydrozimaldehyd (1.5 Äquivv.) in 5 ml Dimethylformamid dazugegeben. Nach Zugabe von 100 µl einer wässrigen Lösung von Fructose-1,6-diphosphataldolase (ca. 10 U) wurde bei 25 °C stehen gelassen. Die Reaktion war nach 9 h beendet. Das Produkt wurde als Bis(dicyclohexylammonium)-Salz kristallisiert. Chemische Ausbeute: 620 mg (93 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an 5,6-Didesocyx-6-phenyl-D-Threo-hexulose: 200 mg (96 % d. Th.).

Beispiel 8

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (5 mmol) mit D-Glycerinaldehyd umgesetzt, wobei mit an Eupergit[®] immobilisierter Rhamnulose-1-phosphataldolase (1.0 g, ca. 20 U) unter mechanischem Rühren der Reaktionslösung gearbeitet wurde. Die Reaktion war nach 24 h beendet. Das Produkt wurde als Bis(cyclohexylammonium)-Salz isoliert. Chemische Ausbeute: 1925 mg (84 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an L-Fructose: 735 mg (97 % d. Th.).

Beispiel 9

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (1 mmol) mit 3,3-Diethoxypropionaldehyd bei pH 6.8 und 20 °C in Gegenwart von Fuculose-1-phosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 16 h beendet. Zur Isolierung des Produkts wurde die Reaktionsmischung mit 380 mg (1.5 mmol) Bariumacetat versetzt und die geringe Menge eines flockigen Niederschlags durch Filtration durch Celite entfernt. Die Lösung wurde auf 4 °C gekühlt, der pH auf 8.0 eingestellt und 50 ml Ethanol zugegeben. Das bei 4 °C als Bariumsalz ausfallende Produkt wurde durch Zentrifugieren isoliert und mit Ethanol, dann Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Chemische Ausbeute: 308 mg (68 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Nach Überführen des Produkts in das Natriumsalz durch Rühren einer wäßrigen Suspension mit Dowex 50W-X8/Na⁺ und Filtrieren von Austauschharz wurde mit Natronlauge der pH auf 8.5 eingestellt. Nach Zugabe von alkalischer Phosphatase (ca. 100 U) wurde bei 20 °C stehen gelassen und die Reaktion dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Nach 36 h war die Reaktion beendet, die Lösung wurde entsalzt (Dowex 50W-X8/H⁺ und 1-X8/OH⁻) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Chemische Ausbeute an 2-Desoxy-D-erythro-hexos5-ulose-1,1-diethylacetal: 140 mg (87 % d. Th.).

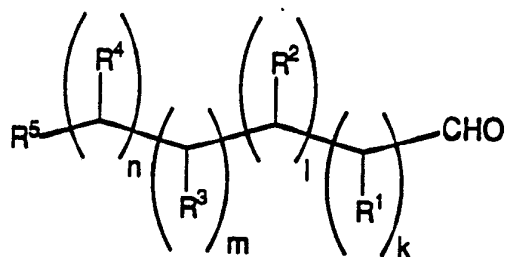
Beispiel 10

Entsprechend Beispiel 1 wurde Dihydroxyacetonphosphat (1 mmol) mit 3-Hydroxypropionaldehyd (1.5 Äquivv.) bei pH 6.8 in Gegenwart von Rhamnulose-1-phosphataldolase umgesetzt. Die Reaktion war nach 15 h beendet. Die Isolierung des Produkts erfolgte als Bis(cyclohexalammonium)-Salz. Chemische Ausbeute: 411 mg (93 % d. Th.). Enantio- bzw. Diastereomerenreinheit: >> 99 %/≥ 97 %.

Die Hydrolyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Chemische Ausbeute an 5-Desoxy-L-threo-hexulose (5-Desoxy-L-fructose): 145 mg (95 % d. Th.).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung enantio- und diastereomeren-reiner Ketosen durch Umsetzung von Aldehyden mit Dihydroxyacetonphosphat in Gegenwart eines Enzyms in wässrigem Medium und nachfolgende Hydrolyse, dadurch gekennzeichnet, daß die von den Aldehyden abzuleitende Ketose-1-phosphate aller vier absoluten Konfigurationen gezielt in Abhängigkeit der eingesetzten Enzyme - Fructose-1,6-diphosphataldolase ([EC 4.1.2.13]; D-threo = (3S, 4R)-Konfiguration), Tagatose-1,6-diphosphataldolase (nicht klassifiziert; L-erythro- = (3S, 4S)-Konfiguration), Fucose-1-phosphataldolase ([EC 4.1.2.17]; D-erythro- = (3R, 4R)-Konfiguration) bzw. Rhamnulose-1-phosphataldolase ([EC 4.1.2.19]; L-threo- = (3R, 4S)-Konfiguration - erhalten werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man aliphatische, heterocyclische oder heteroaromatische Aldehyde einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Aldehyd der allgemeinen Formel vom Typ A, B, C oder D einsetzt.



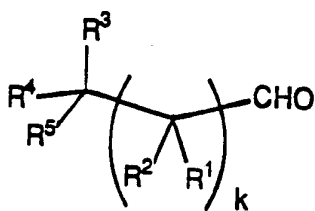
Typ A

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 unabhängig voneinander = H, CH_3 , CH_2CH_3 , Phenyl, Halogen, OH, OR^7 , OR^8 , SH, SR^7 , NH_2 , NHR^7 , NHR^8 , NR^7_2 , N_3 , =O, =NH, = NR^7 , CH_2OH , CH_2OR^7 , CH_2OR^8 , CHO, COCH_3 , COOH, COOR^7 , CONH_2 ,

$R^7 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{Benzyl}$

$R^8 = \text{COCH}_3$

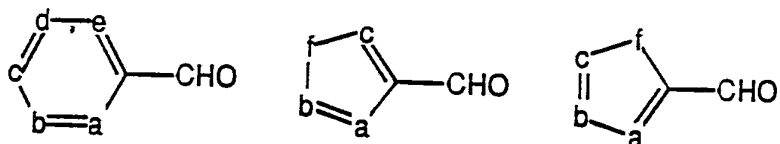
k, l, m, n unabhängig voneinander = 0, 1 oder 2



Typ B

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 unabhängig voneinander = H, CH_3 , CH_2CH_3

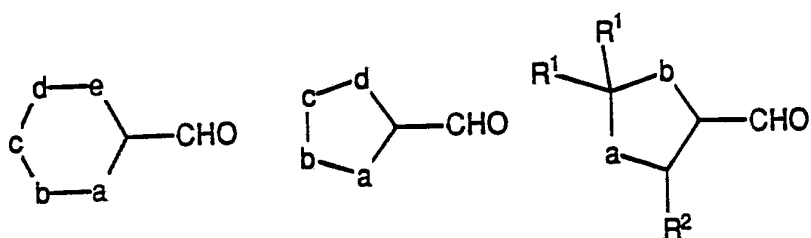
$k = 0, 1, 2$ oder 3



Typ C

a, b, c, d, e unabhängig voneinander = N oder CH

f = NH, O, S oder CH₂



Typ D

a, b, c, d, e unabhängig voneinander = N, O, S oder CH₂

R¹ = H oder CH₃ R² = H, CH₃, CH₂OH, CHO, CH₂Oalkyl, COOH, COOalkyl

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als aliphatischen Aldehyd Acet-, Propion-, n- oder i-Butyraldehyd, Hydrozimt-, Hydratrop-, Phenylacet-aldehyd, Glykol-, 3 Hydroxypropion-, 3-Hydroxy-2-methylpropion-, 3- bzw. 4-Hydroxybutyr-, 3-Oxobutyr- und 3,3-Diethoxypropionaldehyd, Glyoxylsäure oder Bernsteinsäuresemialdehyd, sowie Thioacet-, Chloracet-, Bromacet-, Acetylaminoacet-, Dimethylaminoacet- bzw. -propion- oder -butyraldehyd, enantiomerenreine Glycerin-, Lact- oder Weinsäuresemi-aldehyde, C₄- bis C₆-Monosaccharide und speziell deren 2-Deoxyderivate (2-Deoxytetrose, -ribose, -glucose und -galactose) einsetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als heterocyclischen Aldehyd Tetrahydrofurfural, Thiazolidin-, Oxazolidincarb-aldehyd, Aceton- oder Form-aldehydacetale des Glycerin- oder Dihydroxybutyraldehyds einsetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als heteroaromatischen Aldehyd Pyridin-, Pyrimidin-, Pyrazin-, Pyrazol-, Imidazol- oder Pyrrolcarb-aldehyd einsetzt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man Aldolasen der Klasse 2 aus mikrobiellen Quellen verwendet.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion bei pH 6.0 bis 6.9 durchführt.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Reaktions-temperatur von - 5 °C bis + 40 °C wählt.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man bis zu 50 % organisches Cosolvens zusetzt.
11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als stabilisierende Zusätze Schwermetallsalze, Alkalimetallsalze oder Thiol-reagenzien einsetzt.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Enzyme in immobilisierter Form einsetzt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP92/00781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁵ : C12P 19/02; C12P 7/60; C12N 9/88; //C07H 3/02
C07H 3/08C07H 7/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁵ : C12P; C12N; C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE, A, 3940431 (FORSCHUNGSZENTRUM JULICH) 7 March 1991 see the whole document	1-7
X	--- JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. volume 112, 1990, GASTON, PA US pages 4970 - 4971; AKIO OZAKI ET AL.: "Overproduction and substrate specificity of a bacterial Fuculose-1-phosphate aldolase : A new enzymatic catalyst for stereocontrolled aldol condensation." (cited in the application) see the whole document	1-5,7
X	--- BIOCHEMISTRY. volume 8, 1969, EASTON, PA US pages 98 - 108; TEH-HSING CHIU ET AL.: "L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase from Escherichia coli. Crystallization and properties" (cited in the application) see the whole document ./.	1-4,7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 1992 (14.07.92)

Date of mailing of the international search report

24 July 1992 (24.07.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP92/00781

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY. volume 53, 1988, EASTON US pages 4175 - 4181; J.R. DURRWACHTER ET AL.: " Fructose-1, 6-diphosphate aldolase catalyzed. stereoselective synthesis of C-alkyl and N-containing sugars : Thermodynamically controlled C-C bond formations" see the whole document	1-4
X	--- JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. volume 108, 1986, GASTON, PA US pages 7812 - 7818; J.R. DURRWACHTER ET AL.: "Enzymatic aldol condensation/isomerization as a route to unusual sugar derivatives. see the whole document	1-4
X	--- JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. volume 111, 1989, GASTON, PA US pages 624 - 627; NICHOLAS J. TURNER ET AL.: "A combined chemical-enzymatic synthesis of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate" see the whole document	1-4
X	--- TETRAHEDRON LETTERS. volume 28, No. 15, 1987, OXFORD GB pages 1641 - 1644; F. EFFENBERGER ET AL.: "A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions" (cited in the application) see the whole document	1-4
X	--- JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. volume 111, 1989, GASTON, PA US pages 627 - 635; M. D. BEDNARSKI ET AL.: "Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis" (cited in the application) see the whole document	1-4
X	--- WO, A, 8303846 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 10 November 1983 (cited in the application) see claims	1-4
P,X	--- ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION. volume 30, No. 5, 1991, WEINHEIM DE pages 555 - 558; W.D. FESSNER ET AL.: "Diastereoselective enzymatic aldol additions : L-Rhamnulose and L-Fuculose-1-phosphate aldolases from E. coli" see the whole document ./.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP92/00781

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

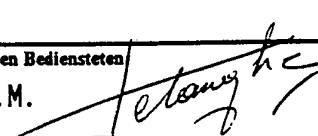
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION. volume 31, No. 1, 1992, WEINHEIM DE pages 56 - 58; W.D. FESSNER ET AL.: "One-pot synthesis of Tagatose-1,6-biphosphate by diastereoselective enzymatic aldol addition." see the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9200781
SA 58013

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 14/07/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-3940431	07-03-91	EP-A- 0431548 JP-A- 3224485	12-06-91 03-10-91
WO-A-8303846	10-11-83	EP-A,B 0107652	09-05-84

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12P19/02; C12P7/60; C12N9/88; //C07H3/02 C07H3/08C07H7/027		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12P ; C12N ; C07H	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	DE,A,3 940 431 (FORSCHUNGSZENTRUM JULICH) 7. März 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-7
X	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Bd. 112, 1990, GASTON, PA US Seiten 4970 - 4971; AKIO OZAKI ET AL.: 'Overproduction and substrate specificity of a bacterial Fuculose-1-phosphate aldolase: A new enzymatic catalyst for stereocontrolled aldol condensation.' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/-	1-5,7
⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
14. JULI 1992	24.07.92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	DELANGHE L. L. M. 	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BIOCHEMISTRY. Bd. 8, 1969, EASTON, PA US Seiten 98 - 108; TEH-HSING CHIU ET AL.: 'L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase from Escherichia coli. Crystallization and properties' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4,7
X	<p>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY. Bd. 53, 1988, EASTON US Seiten 4175 - 4181; J.R. DURRWACHTER ET AL.: 'Fructose-1,6-diphosphate aldolase catalyzed stereoselective synthesis of C-alkyl and N-containing sugars: Thermodynamically controlled C-C bond formations' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4
X	<p>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Bd. 108, 1986, GASTON, PA US Seiten 7812 - 7818; J.R. DURRWACHTER ET AL.: 'Enzymatic aldol condensation/isomerization as a route to unusual sugar derivatives.' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4
X	<p>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Bd. 111, 1989, GASTON, PA US Seiten 624 - 627; NICHOLAS J. TURNER ET AL.: 'A combined chemical-enzymatic synthesis of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4
X	<p>TETRAHEDRON LETTERS. Bd. 28, Nr. 15, 1987, OXFORD GB Seiten 1641 - 1644; F. EFFENBERGER ET AL.: 'A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4
X	<p>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Bd. 111, 1989, GASTON, PA US Seiten 627 - 635; M.D. BEDNARSKI ET AL.: 'Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4

-/--

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,8 303 846 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 10. November 1983 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche ---	1-4
P,X	ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION. Bd. 30, Nr. 5, 1991, WEINHEIM DE Seiten 555 - 558; W.D. FESSNER ET AL.: 'Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-Rhamnulose and L-Fuculose-1-phosphate aldolases from E. coli.' siehe das ganze Dokument ---	1-12
P,X	ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION. Bd. 31, Nr. 1, 1992, WEINHEIM DE Seiten 56 - 58; W.D. FESSNER ET AL.: 'One-pot synthesis of Tagatose-1,6-bisphosphate by diastereoselective enzymatic aldol addition.' siehe das ganze Dokument ---	1-12

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9200781
SA 58013

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 14/07/92
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

14/07/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-3940431	07-03-91	EP-A- 0431548 JP-A- 3224485	12-06-91 03-10-91
WO-A-8303846	10-11-83	EP-A,B 0107652	09-05-84

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82