

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

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 41/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/45133</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. September 1999 (10.09.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01113</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Februar 1999 (20.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 09 649.6 6. März 1998 (06.03.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOLLA, Wolfgang [DE/DE]; Kuckucksweg 7, D-65779 Kelkheim (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(54) Title: METHOD FOR ENZYMATIC ENANTIOMER-SEPARATION OF 3(R)- AND 3(S)-HYDROXY-1- METHYL-4-(2,4, 6-TRIMETHOXYPHENYL)-1, 2,3,6- TETRAHYDRO-PYRIDINE OR ITS CARBOXYLIC ACID ESTERS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFARHEN ZUR ENZYMATISCHEN ENANTIOMEREN-TRENNUNG VON 3(R)- UND 3(S)-HYDROXY-1- METHYL-4-(2,4, 6-TRIMETHOXYPHENYL)-1, 2,3,6- TETRAHYDRO-PYRIDIN BZW. DER CARBONSÄUREESTER</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for producing optically pure compounds of 3(R)- and 3(S)-hydroxy-1- methyl-4-(2,4, 6-trimethoxyphenyl)-1, 2,3,6- tetrahydro-pyridine or its carboxylic acid esters by reacting the enantiomer mixtures stereoselectively, using an enzyme.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es ist ein Verfahren zur Herstellung optisch reiner Verbindungen von 3(R)- und 3(S)-Hydroxy-1-methyl-4-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin bzw. der Carbonsäureester durch stereodifferenzierende Umsetzung der Enantiomeren-Gemische mit Hilfe eines Enzyms beschrieben.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Niger
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur enzymatischen Enantiomeren-Trennung von 3(R)- und 3(S)-Hydroxy-1-methyl-4-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin bzw. der Carbonsäureester

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung optisch reiner Verbindungen der Formel (I) durch stereodifferenzierende Umsetzung der Enantiomeren-Gemische mit Hilfe eines Enzyms.

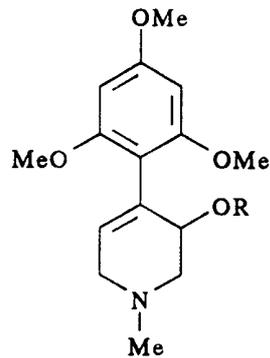
3(S)- bzw. 3(R)- Hydroxy-1-methyl-4-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin (Verbindungen der Formel (I) mit R = H) bzw. deren Esterderivate (Verbindungen der Formel (I) mit R = COR¹) sind zentrale Bausteine bzw. Vorstufen der in der Patentanmeldung HMR 98/L 001 („Verfahren zur Herstellung von (-)cis -3-Hydroxy-1-methyl-4(R)-(2,4,6-trimethoxyphenyl)piperidin“) beschriebenen Synthese des Flavopiridols (HMR 1275 oder L 86 8275), des ersten potenten Inhibitors der cyclin-abhängigen Protein-Kinase (siehe z.B. Sedlacek, Hans Harald; Czech, Joerg; Naik, Ramachandra; Kaur, Gurmeet; Worland, Peter; Losiewicz, Michael; Parker, Bernard; Carlson, Bradley; Smith, Adaline; et al. Flavopiridol (L 86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. Int. J. Oncol. (1996), 9(6), 1143-1168 oder Czech, Joerg; Hoffmann, Dieter; Naik, Ramachandra; Sedlacek, Hans-Harald; Antitumoral activity of flavone L 86 8275. Int. J. Oncol. (1995), 6(1), 31-36).

Eine Racematspaltung bzw. Enantiomeren-Trennung der Verbindungen der Formel (I) ist nicht bekannt.

Es wurde nun gefunden, daß Verbindungen der Formel (I) aus den Enantiomeren-Gemischen durch enzymatische Esterspaltung (Hydrolyse oder Alkoholyse) in optisch reiner Form erhalten werden können.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur kinetischen Racematspaltung von Verbindungen der Formel (I),

2



(I)

das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Enantiomeren-Gemische bzw. racemische Gemische von Verbindungen der Formel (I), in der

R steht für COR^1 mit $\text{R}^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{16})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{16})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{16})\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{-Cycloalkyl}$ mit $n = 1\text{-}16$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, J, CF_3 , CN, NO_2 , Hydroxy, Methoxy, Ethoxy und COOR^2 , mit $\text{R}^2 = (\text{C}_1\text{-C}_4)\text{-Alkyl}$ und $(\text{C}_2\text{-C}_4)\text{-Alkenyl}$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 ,

in homogenen oder heterogenen, wäßrigen, wäßrig-organischen oder organischen Medien in Gegenwart eines Enzyms, z.B. einer Lipase oder Esterase, z. B. aus Säugetier-Lebern oder -Bauchspeicheldrüsen oder mikrobiellen Ursprungs, wie beispielsweise aus Candida, Pseudomonas und Aspergillus, oder einer Protease, z. B. aus Bacillus, einer stereoselektiven Hydrolyse oder Alkohololyse bei einer Temperatur von 10 - 80 °C gegebenenfalls in Gegenwart von Cosolventien und eines Puffers unterwirft wobei die Reaktionsmischung vorzugsweise 2 - 50 Gew.-% Ester enthält

und nach Ablauf der Reaktion den nicht umgesetzten Ester (Verbindung der Formel (I) mit $R = \text{COR}^1$) und den gebildeten Alkohol (Verbindung der Formel (I) mit $R = \text{H}$) - und somit beide Enantiomere - trennt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ökonomisch, einfach und schnell. Die Reaktion erfordert keine äquimolaren Mengen optisch reiner Hilfsstoffe, keine teuren Reagenzien, keine unverhältnismäßig großen Lösungsmittelmengen und keine kostenintensiven Arbeitsschritte. Nach Beendigung der Reaktion kann die Trennung der Produkte bzw. der Enantiomeren durch einfache Maßnahmen, z. B. durch Extraktion, erfolgen.

Bevorzugt steht in den Verbindungen der Formel (I)

R für COR^1 mit $R^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{12})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{12})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{12})\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{-Cycloalkyl}$ mit $n = 1\text{-}12$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 , CN, NO_2 , Hydroxy, Methoxy, Ethoxy und COOR^2 , mit $R^2 = \text{Methyl}$, Ethyl und Vinyl, die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF_3 .

Besonders bevorzugt steht in den Verbindungen der Formel (I)

R für COR^1 mit $R^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{10})\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{-Cycloalkyl}$ mit $n = 1\text{-}10$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 , CN, NO_2 , Methoxy, und COOR^2 , mit $R^2 = \text{Methyl}$, Ethyl und Vinyl, die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF_3 .

Ganz besonders bevorzugt steht in den Verbindungen der Formel (I)

R für COR^1 mit $R^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{10})\text{-Alkynyl}$,

die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF₃, und Methoxy.

Bei dem Verfahren geht man vorzugsweise so vor, daß man einen Ester der Formel (I), beispielsweise $R = COR^1$ mit $R^1 = C_3H_7$ oder C_8H_{17} in einer wasser- oder alkoholhaltigen Lösung mit einer Lipase, Esterase oder Protease versetzt und rührt. Es kann vorteilhaft sein, die genannte Lösung zu puffern, z. B. mit Phosphat- oder TRIS [= Tris-(hydroxymethyl)-methylamin]-Puffer. Der Zusatz kann z. B. 0.01-1.0 molar sein. Ein günstiger Pufferbereich ist pH 5-9.

Es kann weiterhin vorteilhaft sein, Cosolventien zuzugeben. Als Cosolvens eignen sich z. B. Dimethoxyethan, Aceton, THF, Dioxan, Hexan, tert.-Butylmethylether und tert.-Butanol. Der Anteil an Cosolvens in der Lösung liegt vorzugsweise bei 10-80 %.

Als Enzyme werden bevorzugt Lipasen und Esterasen, wie z. B. Cholesterolesterase (EC 3.1.1.13) aus Rinderpankreas (Sigma Chemical Co.), Schweineleberesterase (PLE (porcine liver esterase), Sigma Chemical Co.), Pankreatin (Fluka und Sigma Chemical Co.), Pankreas-Acetonpulver vom Rind (Sigma Chemical Co.), Leber-Acetonpulver vom Pferd (Sigma Chemical Co.) und Lipase aus Schweinepankreas (PPL (porcine pancreas lipase), Sigma Chemical Co.), Lipase OF aus *Candida rugosa* (Meito Sangyo) und Lipase AP-6 aus *Aspergillus niger* (Amano Pharmaceuticals) eingesetzt.

Jedes der genannten Enzyme kann in freier oder in immobilisierter Form (Immobilized Biocatalysts, W. Hartmeier, Springer Verlag Berlin, 1988) eingesetzt werden. Die Enzymmenge wird in Abhängigkeit von der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. von der angestrebten Reaktionszeit und von der Art des Enzyms (z. B. frei oder immobilisiert) frei gewählt und ist durch einfache Vorversuche leicht zu bestimmen.

Die Reaktionsmischung enthält vorzugsweise 2-50 Gew.-% Ester, besonders bevorzugt 5-20 %. Die Reaktionstemperatur beträgt 10-80 °C, bevorzugt 20-60 °C, besonders bevorzugt 20-40 °C.

Die Herstellung der Ester (Verbindungen der Formel I mit $R = COR^1$) erfolgt zweckmäßigerweise aus dem Alkohol (Verbindung der Formel I mit $R = H$) nach bekannten Methoden der Veresterung (Haslam, Tetrahedron 1980, 36, 2409; Höfle, Steglich, Vorbrüggen, Angew. Chem. 1978, 90, 602) oder wie in der Patentanmeldung HMR 98/L 001 („Verfahren zur Herstellung von (-)-cis-3-Hydroxy-1-methyl-4(R)-(2,4,6-trimethoxyphenyl)piperidin“) beschrieben.

Die bei dem Verfahren entstehenden bzw. verbleibenden Produkte lassen sich auf einfache Weise trennen, z. B. durch Extraktion oder chromatographische Methoden. Den verbleibenden Ester erhält man z. B. durch Verteilen der Reaktionslösung zwischen Wasser und n-Heptan und Einengen der organischen Phase. Der entstandene Alkohol kann dann aus der wäßrigen Phase mit Essigsäureethylester extrahiert werden. Die Wiedergewinnung des Enzyms kann durch Gefriertrocknung erfolgen. Die Abtrennung (und ggf. spätere Wiederverwendung) des Enzyms kann durch Immobilisierung erleichtert werden.

Durch geeignete Reaktionsführung gelingt es immer, zumindest ein Enantiomeres optisch rein zu erhalten. Strebt man optisch reinen Ester an, sollte der Umsatz über (oder gleich) 50 % sein, strebt man optisch reinen Alkohol an, sollte der Umsatz kleiner (oder gleich) 50 % sein. Die Umsatzbestimmung der enzymatischen Hydrolyse oder Alkoholyse erfolgte mit HPLC (RP 18 LiChrosorb®), die Bestimmung der optischen Reinheit wurde per HPLC (Chiralpak AD) durchgeführt. Die bei dem Verfahren der Racematspaltung entstehenden bzw. verbleibenden Ester lassen sich nach bekannten Methoden der Esterspaltung (S.J. Salomon, E.G. Mata, O.A. Mascaretti, Tetrahedron 1993, 49, 3691-3748) ohne Inversion oder Racemisierung in den korrespondierenden Alkohol überführen. Umgekehrt läßt sich der entstehende Alkohol nach bekannten Methoden der Veresterung (Haslam,

Tetrahedron 1980, 36, 2409) ohne Inversion oder Racemisierung in den korrespondierenden Ester überführen.

Die bei dem Verfahren entstehenden bzw. verbleibenden Produkte lassen sich nach bekannten Methoden, z.B. durch metallkatalysierte Umlagerungen (L.E. Overman, Angew. Chem. 1984, 96, 565-573 und bereits zitierte Literatur), racemisieren und erneut in die Racematspaltung einsetzen. Dies erhöht die Ausbeute auf über 50 %. Beispielsweise lassen sich die Verbindungen der Formel (I) mit $R = COR^1$ direkt und die der Formel (I) mit $R = H$ z.B. nach Überführung in geeignete Derivate, wie sie in L.E. Overman, Angew. Chem. 1994, 96, 565-573 beschrieben sind, racemisieren. Als Metallkatalysatoren können beispielsweise Hg(II)-, Pd(0)- oder Pd(II)-Verbindungen bzw. -Salze verwendet werden.

Durch die nachfolgende Beispiele soll die vorliegende Erfindung näher erläutert werden.

Beispiele:

Alle isolierten Produkte bzw. Rohproduktgemische wurden durch 1H -NMR- und Massen-Spektren bzw per HPLC identifiziert.

Die optische Reinheit der Produkte wurde durch HPLC, z. B an Chiralpak AD 250 X 4.6 (Daicel) bestimmt.

Beispiel 1:

10 mg des Essigsäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = COR^2$ und $R^2 = COCH_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0) / Dimethoxyethan

(5:1) vorgelegt. 5 mg Pankreatin wurden zugegeben. Es wurde bei 20-25 °C gerührt bis der Umsatz ca. 40 % (HPLC) erreicht hatte. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 5 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht: ee des verbliebenen (R)-Essigsäureesters: 63 %; ee des (S)-Alkohols: 85 %.

Beispiel 2:

10 mg des Buttersäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = \text{COR}^2$ und $R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/ Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg PPL (Lipase aus Schweinepankreas, Sigma Chemical Co.) wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis der Umsatz ca. 48 % (HPLC) erreicht hatte. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht: ee des (R)-Buttersäureesters: 90 %; ee des (S)-Alkohols: 97 %.

Beispiel 3:

1.0 g (2.86 mmol) des Buttersäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = \text{COR}^2$ und $R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$] wurden in 8 mL Dimethoxyethan und 40 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0) vorgelegt. 90 mg Pankreatin wurden zugegeben. Es wurde bei 22-25 °C gerührt bis der Umsatz 50 % überschritten hatte. Dann wurde im Vakuum eingengt, mit Wasser versetzt und sechsmal mit ca. 50 mL n-Heptan extrahiert. Nach Trocknen (Na_2SO_4) wurde im Vakuum eingengt. Man erhielt 450 mg (45 %) des (R)-Buttersäureesters; ee (HPLC): ≥ 99 %. Nach Extraktion der verbliebenen Wasserphase mit Essigsäureethylester, Trocknen (Na_2SO_4) und Einengen im Vakuum erhielt man 190 mg (23.8 %) des (S)-Alkohols; ee (HPLC): 97 %.

Beispiel 4:

10 mg des Buttersäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = \text{COR}^2$ und $R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg PPL wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis ein Umsatz von ca. 48 % (HPLC) erreicht war. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht: ee des (R)-Buttersäureesters: 90 %; ee des (S)-Alkohols: 97 %.

Beispiel 5:

10 mg des Buttersäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = \text{COR}^2$ und $R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg PLE (Schweinleber-Esterase, Sigma Chemical Co.) wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis ein Umsatz von ca. 47 % (HPLC) erreicht war. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht: ee des (R)-Buttersäureesters: 88 %; ee des (S)-Alkohols: 97 %.

Beispiel 6:

10 mg des Capronsäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = \text{COR}^2$ und $R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg PLE wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis ein Umsatz von ca. 40 % (HPLC) erreicht war. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht: ee des (R)-Capronsäureesters: 66 %; ee des (S)-Alkohols: 96 %.

Beispiel 7:

10 mg des Capronsäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = \text{COR}^2$ und $R^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg Cholesterolesterase aus Rinderpankreas

wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis ein Umsatz von ca. 50 % (HPLC) erreicht war. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht:
ee des (R)-Capronsäureesters: ≥ 99.8 %; ee des (S)-Alkohols: ≥ 99.8 %.

Beispiel 8:

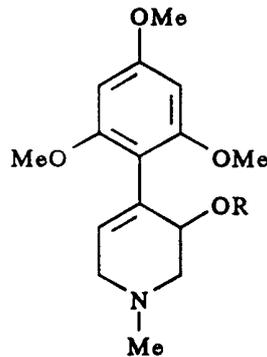
10 mg des Caprinsäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = COR^2$ und $R^2 = CO(CH_2)_8CH_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/ Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg PPL wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis ein Umsatz von ca. 10 % (HPLC) erreicht war. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht:
ee des (R)-Caprinsäureesters: ≥ 11 %; ee des (S)-Alkohols: 95 %.

Beispiel 9:

10 mg des Buttersäureesters [Verbindung der Formel I mit $R^1 = COR^2$ und $R^2 = CO(CH_2)_2CH_3$] wurden in 1 mL Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH = 7.0)/ Dimethoxyethan (5:1) vorgelegt. 5 mg Pferdeleber-Acetonpulver wurden zugegeben. Es wurde bei 30 °C gerührt bis ein Umsatz von ca. 46 % (HPLC) erreicht war. Dann wurde filtriert, zur Trockne eingengt und die resultierende Mischung per HPLC (Chiralpak AD 250 x 4.6, n-Hexan + EtOH 6 + 1, Fluß 1 mL/min, 25 °C, 220/240 nm) untersucht:
ee des (R)-Buttersäureesters: 82 %; ee des (S)-Alkohols: 96 %.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur kinetischen Racematspaltung von Verbindungen der Formel (I),



(I)

dadurch gekennzeichnet, daß man Enantiomeren-Gemische bzw. racemische Gemische von Verbindungen der Formel (I), in der

- R steht für COR^1 mit $\text{R}^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{16})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{16})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{16})\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{-Cycloalkyl}$ mit $n = 1\text{-}16$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, J, CF_3 , CN, NO_2 , Hydroxy, Methoxy, Ethoxy und COOR^2 , mit $\text{R}^2 = (\text{C}_1\text{-C}_4)\text{-Alkyl}$ und $(\text{C}_2\text{-C}_4)\text{-Alkenyl}$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 ,

in homogenen oder heterogenen, wäßrigen, wäßrig-organischen oder organischen Medien in Gegenwart eines Enzyms einer stereoselektiven Hydrolyse oder Alkohololyse bei einer Temperatur von 10 - 80 °C gegebenenfalls in Gegenwart von Cosolventien und eines Puffers unterwirft wobei die Reaktionsmischung vorzugsweise 2 - 50 Gew.-% Ester enthält

und nach Ablauf der Reaktion den nicht umgesetzten Ester (Verbindung der Formel (I) mit $R = \text{COR}^1$) und den gebildeten Alkohol (Verbindung der Formel (I) mit $R = \text{H}$) - und somit beide Enantiomere - trennt.

2. Verfahren zur kinetischen Racematspaltung von Verbindungen der Formel (I), gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

R für COR^1 mit $R^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{12})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{12})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{12})\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{-Cycloalkyl}$ mit $n = 1\text{-}12$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 , CN, NO_2 , Hydroxy, Methoxy, Ethoxy und COOR^2 , mit $R^2 = \text{Methyl}$, Ethyl und Vinyl, die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF_3 steht.

3. Verfahren zur kinetischen Racematspaltung von Verbindungen der Formel (I), gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß

R für COR^1 mit $R^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{10})\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{-Cycloalkyl}$ mit $n = 1\text{-}10$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 , CN, NO_2 , Methoxy, und COOR^2 , mit $R^2 = \text{Methyl}$, Ethyl und Vinyl, die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF_3 steht.

4. Verfahren zur kinetischen Racematspaltung von Verbindungen der Formel (I) gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß

R für COR^1 mit $R^1 = (\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyl}$ bzw. $(\text{C}_3\text{-C}_{10})\text{-Alkynyl}$, die verzweigt oder nichtverzweigt sein können und die substituiert sein können mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, Br, CF_3 , und Methoxy steht.

5. Verfahren zur kinetischen Racematspaltung von Verbindungen der Formel (I) gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Enzym eine Lipase, Esterase oder Protease verwendet wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P41/00

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)

IPC 6 C12P

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 practical, 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.
Y	EP 0 321 918 A (HOECHST AG) 28 June 1989 see the whole document ---	1-5
Y	EP 0 507 278 A (HOECHST AG) 7 October 1992 see the whole document ---	1-5
Y	US 4 971 909 A (CHISSO CORP.) 20 November 1990 see the whole document ---	1-5
Y	EP 0 474 129 A (ACHIWA, KAZUO) 11 March 1992 see the whole document ---	1-5
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in 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

11 June 1999

Date of mailing of the international search report

22/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/01113

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9418 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 94-147005 XP002105673 & JP 06 090790 A (MERCIAN CORP) , 5 April 1994 see abstract -----	1-5

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/01113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0321918 A	28-06-1989	DE 3743824 A	06-07-1989
		DE 3888650 D	28-04-1994
		JP 1202296 A	15-08-1989
		JP 1975072 C	27-09-1995
		JP 7002118 B	18-01-1995
		US 4963492 A	16-10-1990
EP 0507278 A	07-10-1992	AU 647603 B	24-03-1994
		AU 1393792 A	08-10-1992
		CA 2064676 A	03-10-1992
		JP 5192145 A	03-08-1993
US 4971909 A	20-11-1990	JP 1060398 A	07-03-1989
		JP 2691986 B	17-12-1997
		DE 3876039 A	24-12-1992
		EP 0304706 A	01-03-1989
EP 0474129 A	11-03-1992	JP 6041075 A	15-02-1994
		DE 69123667 D	30-01-1997
		DE 69123667 T	15-05-1994
		US 5336774 A	09-08-1994
		US 5234821 A	10-08-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01113

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12P41/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 321 918 A (HOECHST AG) 28. Juni 1989 siehe das ganze Dokument ---	1-5
Y	EP 0 507 278 A (HOECHST AG) 7. Oktober 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-5
Y	US 4 971 909 A (CHISSO CORP.) 20. November 1990 siehe das ganze Dokument ---	1-5
Y	EP 0 474 129 A (ACHIWA, KAZUO) 11. März 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-5
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen 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
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"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)		"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. Juni 1999		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 22/06/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Douschan, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01113

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p> DATABASE WPI Section Ch, Week 9418 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 94-147005 XP002105673 & JP 06 090790 A (MERCIAN CORP) , 5. April 1994 siehe Zusammenfassung ----- </p>	1-5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01113

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0321918 A	28-06-1989	DE 3743824 A	06-07-1989
		DE 3888650 D	28-04-1994
		JP 1202296 A	15-08-1989
		JP 1975072 C	27-09-1995
		JP 7002118 B	18-01-1995
		US 4963492 A	16-10-1990
EP 0507278 A	07-10-1992	AU 647603 B	24-03-1994
		AU 1393792 A	08-10-1992
		CA 2064676 A	03-10-1992
		JP 5192145 A	03-08-1993
US 4971909 A	20-11-1990	JP 1060398 A	07-03-1989
		JP 2691986 B	17-12-1997
		DE 3876039 A	24-12-1992
		EP 0304706 A	01-03-1989
EP 0474129 A	11-03-1992	JP 6041075 A	15-02-1994
		DE 69123667 D	30-01-1997
		DE 69123667 T	15-05-1994
		US 5336774 A	09-08-1994
		US 5234821 A	10-08-1993