



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 417**

(51) Int. Cl.:
C12P 7/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07728317 .4**

(96) Fecha de presentación : **19.04.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2013352**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

(54) Título: **Procedimiento para la racemización de alcoholes secundarios, ópticamente activos, con empleo de alcohol-dehidrogenasas.**

(30) Prioridad: **21.04.2006 EP 06112908**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2009

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

(72) Inventor/es: **Stürmer, Rainer;**
Kroutil, Wolfgang;
Faber, Kurt y
Gruber, Christian

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

ES 2 328 417 T3

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

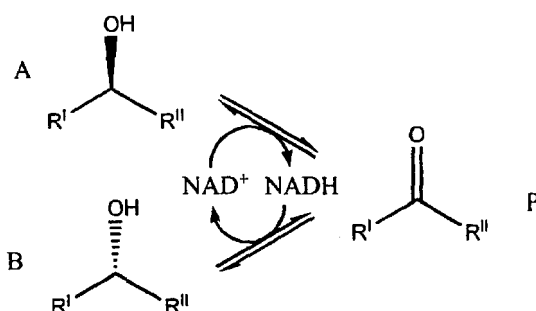
DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la racemización de alcoholes secundarios, ópticamente activos, con empleo de alcohol-dehidrogenasas.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la racemización enzimática de alcoholes secundarios, ópticamente activos.

Estado de la técnica

Las alcohol-dehidrogenasas secundarias catalizan la oxidación de los alcoholes secundarios o bien la reducción de la cetona correspondiente para dar el alcohol.



La presente invención se refiere a un procedimiento para la racemización de alcoholes secundarios, ópticamente activos, mediante incubación de estos alcoholes con, al menos, una alcohol-dehidrogenasa de la clase E.C. 1.1.1.

Como alcoholes secundarios, ópticamente activos, puede emplearse en el procedimiento, de conformidad con la invención, una pluralidad de alcoholes estructuralmente diferentes o bien de compuestos que contengan grupos alcohólicos secundarios.

Son adecuados los alcoholes alifáticos con una longitud de la cadena comprendida entre 4 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono, pudiendo estar el resto alifático ramificado o no ramificado, monoinsaturado o poliinsaturado o pudiendo ser incluso cíclico o puede formar una parte de un sistema cíclico, por ejemplo de un sistema heterocíclico tal como la morfolina, el pirrol, el tiofenol, el pirazol, el imidazol, el oxazol, el tiazol, la piridina, el pirano, la pirimidina, la piridazina, la pirazina, la cumarona, el indol, la quinolina.

Los alcoholes alifáticos, preferentes, son el 2-butanol, el 2-pentanol, el 2-hexanol, el 3-hexanol, el 2-heptanol, el 3-heptanol, el 2-octanol, el 3-octanol, el 2-nonanol, el 2-decanol.

Otros alcoholes secundarios, adecuados, son aquellos que tengan una estructura aril-alquilo, pudiendo ser la parte aromática homoaromática o heteroaromática.

Los alcoholes, preferentes, son aquellos que portan, como parte aromática, un grupo, en caso dado substituido, fenilo, naftilo, piridilo.

Los alcoholes secundarios, especialmente preferentes, son el fenil-etanol-2, el fenil-propanol-2, el fenil-butanol-2, el fenil-pentanol-2, el fenil-hexanol-2, en caso dado substituidos.

Los alcoholes pueden estar substituidos también una o varias veces, es decir que uno o varios átomos de H pueden estar reemplazados por grupos tales como F, Cl, Br, I, NH_2 , NHR , NR_2 , SH, CN, COOH , COOR , CO, CS, CNH, NO_2 , pudiendo significar R grupos alquilo o grupo alquilarilo.

Como alcohol-dehidrogenasas son adecuadas las óxidorreductasas dependientes de NAD o dependientes de NADP de la clasificación de los enzimas E.C. 1.1.1, de manera especial las alcohol-dehidrogenasas, preferentemente aquellas que hayan sido aisladas a partir de microorganismos o hayan sido aisladas y/o modificadas por medio de procedimientos de ingeniería genética. La modificación puede llevarse a cabo o bien mediante el denominado procedimiento de mutagénesis aleatoria o bien mediante la denominada mutagénesis localmente específica (site-specific mutagenesis).

Como alcohol-dehidrogenasas preferentes son empleadas aquellas que proceden de microorganismos del género *Lactobacillus*, de manera especial del tipo *Lactobacillus kefir* y aquellas del género *Rhodococcus*, de manera especial del tipo *Rhodococcus erythropolis*.

ES 2 328 417 T3

Estas alcohol-dehidrogenasas pueden ser obtenidas en el comercio (por ejemplo en la firma Fluka) o pueden conseguirse en las colecciones de cepas accesibles al público y pueden aislarse con métodos conocidos. Por ejemplo los *Lactobacillus kefir* DSM 20587, ATCC 35411; *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066, ATCC 25544.

Como alcohol-dehidrogenasas son empleadas en una forma preferente de realización, varias alcohol-dehidrogenasas diferentes, de manera preferente aquellas, que tengan una especificidad Prelog diferente, de manera especialmente preferente una alcohol-dehidrogenasa con especificidad Prelog y una segunda alcohol-dehidrogenasa con especificidad anti-Prelog. En lo que se refiere a la definición de la especificidad Prelog se hace referencia al documento Faber, Pure Appl. Chem. 69, 1613-1632, 1997, de manera especial al capítulo de las reacciones Redox, que se incorpora expresamente aquí como referencia.

Desde el punto de vista de razonamientos termodinámicos, cada una de las alcohol-dehidrogenasas puede producir la racemización. La alcohol-dehidrogenasa, empleada para la racemización, debería presentar una enantio/estéreo-selectividad tan baja como fuera posible, tanto para la oxidación así como, también, para la reducción, con objeto de alcanzar una velocidad de racemización tan elevada como sea posible. Puesto que la selectividad es, entre otras cosas, una función de la temperatura, podrá efectuarse la racemización igualmente a temperatura más elevada con un enzima selectivo bajo condiciones normales (por ejemplo la alcohol-dehidrogenasa *L. kefir*), cuando la actividad no se pierda bajo estas condiciones. Las alcohol-dehidrogenasas con una elevada enantioselectividad y con una elevada estéreo-selectividad ($E > 200$) muestran una actividad de racemización lenta.

En el caso de sistemas con dos enzimas o con varios enzimas, la selectividad del sistema de la alcohol-dehidrogenasa se compone a partir de las selectividades de los enzimas empleados. Mediante el empleo simultáneo de un enzima "Prelog" (alcohol-dehidrogenasa *R. erythropolis*) y de un enzima anti-"Prelog" (alcohol-dehidrogenasa *L. kefir*), que presenten, respectivamente, una elevada enantioselectividad o bien una elevada estéreo-selectividad con relación al sustrato, pero que, sin embargo, tengan una preferencia estéreo contrapuesta, la actividad total del sistema es de 1 y se acelera la racemización.

Los enzimas con actividad dehidrogenasa, empleados de conformidad con la invención, pueden ser empleados en el procedimiento de conformidad con la invención en forma de enzima libre o en forma de enzima inmovilizado.

El procedimiento, de conformidad con la invención, se lleva a cabo, de manera ventajosa, a una temperatura comprendida entre 0°C y 95°C, de manera preferente comprendida entre 10°C y 85°C, de manera especialmente preferente comprendida entre 15°C y 75°C.

El valor del pH en el procedimiento, de conformidad con la invención, se mantiene, de manera ventajosa, entre pH 4 y 12, de manera preferente entre pH 4,5 y 9, de manera especialmente preferente entre pH 5 y 8.

El procedimiento, de conformidad con la invención, puede llevarse a cabo, de conformidad con el sustrato, en un disolvente adicional o en el propio sustrato a título de disolvente. Como disolventes entran en consideración todos los disolventes orgánicos usuales, que permitan una reacción Redox enzimática, de manera especial los alcoholes, las cetonas, los éteres, los hidrocarburos o las mezclas de estos productos. De manera ventajosa, se elegirán aquellos disolventes, que permitan una separación fácil del alcohol secundario racémico.

En el procedimiento, de conformidad con la invención, se entenderán por alcoholes ópticamente activos aquellos enantiómeros que presenten un enriquecimiento en enantiómeros. De manera preferente, son empleadas en el procedimiento puras enantiómeras del 70% ee como mínimo, de manera preferente del 80% ee como mínimo, de manera especialmente preferente del 90% ee como mínimo, de una manera muy especialmente preferente del 98% ee como mínimo.

En este caso se entenderá por racemización de los alcoholes ópticamente activos, una disminución de la pureza enantiómera frente al alcohol de partida (sustrato), especialmente una disminución de la pureza enantiómera en 10, en 20, en 25, en 30 puntos en porcentaje. La racemización no debe entenderse en el sentido de que tenga que alcanzarse obligatoriamente una relación entre los enantiómeros del 50 : 50, aún cuando la racemización completa represente una forma preferente de realización de la invención.

La cantidad empleada de cofactor (NAD/NADH o bien NADP/NADPH) carece de importancia para la racemización en tanto en cuanto se asegure que esté presente al menos un mol de NAD⁺ o bien de NADP por mol de enzima, con objeto de asegurar la formación completa del complejo enzima-cofactor. La concentración en cetona, que se forma de manera intermedia, se regula por medio de la relación NAD⁺/NADH empleada así como por medio del potencial Redox alcohol/cetona.

El procedimiento, de conformidad con la invención, puede acoplarse también de manera ventajosa con sistemas para la regeneración del cofactor.

El procedimiento, de conformidad con la invención puede llevarse a cabo tanto de manera continua así como, también, de manera discontinua.

Parte experimental

Alcoholes empleados (substrato)

Número	Nomenclatura	Estructura
1	2-Octanol	
2	2-Heptanol	
3	2-Nonanol	
4	1-Fenil-2-propanol	
5	6-Metil-5-hepten-2-ol	

Enzimas empleados

Abreviatura	Nomenclatura	Fuente
LK-alcohol-dehidrogenasa	Alcohol-dehidrogenasa <i>Lactobacillus Kefir</i>	Comercial Fluka 05643
RE-alcohol-dehidrogenasa	Alcohol-dehidrogenasa <i>Rhodococcus Erythropolis</i>	Comercial Jülich Fine Chemicals 04.11

Enzimas empleados

Soluciones madre enzimáticas	Concentración	U/ml
LK-alcohol-dehidrogenasa	8 mg/ml	3
RE-alcohol-dehidrogenasa	80 mg/ml	3
RE-alcohol-dehidrogenasa & LK-alcohol-dehidrogenasa	4 mg/ml	1,5
	40 mg/ml	1,5

Se disolvieron 50 μ l de la solución madre enzimática en un recipiente de Eppendorf® de 2 ml en 500 μ l de tampón de fosfato (50 mM, pH 7,5) y se añadieron 10 μ l de solución madre NAD⁺/NADH (50 mg de NADH/ml, 30 mg de NAD⁺/ml). A continuación se inició la reacción mediante adición de 2 μ l de substrato (48 h, 30°C/65°C, 130 revoluciones por minuto). La reacción se detuvo mediante extracción con 500 μ l de EtOAc.

Sistema monoenzimático

Substrato	e.e. del substrato ^a [%]	Enzima	Temperatura [°C]	Cetona [%]	e.e. ^{a, b} [%]
		RE-alcohol- dehidrogenasa	30	< 0,1	-98,35
(R)-1	> -99,9	LK-alcohol- dehidrogenasa	30	22,61	-98,04
		LK-alcohol- dehidrogenasa	65	< 0,1	-4,53
(S)-1	> 99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa	30	0,25	99,53
		LK-alcohol- dehidrogenasa	30	0,00	> 99,9
(R)-2	> -99,9	R-alcohol- dehidrogenasa	30	n.d.	< - 99,9
		LK-alcohol- dehidrogenasa	30	n.d.	< - 99,9
(R)-3	> -99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa	30	1,67	-97,54
		LK-alcohol- dehidrogenasa	30	27,30	-93,04
(S)-4	> 99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa	30	3,12	> 99,9
		LK-alcohol- dehidrogenasa	30	3,63	> 99,9
(R)-5	> -99,9	E-alcohol- dehidrogenasa	30	0,56	-98,12
		LK-alcohol- dehidrogenasa	30	24,38	-73,94

^a Los valores e.e. positivos o bien negativos se refieren al exceso del enantiómero correspondiente (S) o bien (R).

^b e.e. al cabo de un tiempo de reacción de 48 horas

Sistema bienzimático

Substrato	e.e. del substrato ^a [%]	Enzima	Temperatura [°C]	Cetona [%]	e.e. ^{a, b} [%]
(R)-1	> -99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa & LK-alcohol- dehidrogenasa	30	2,23	-9,49
(S)-1	> 99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa & LK-alcohol- dehidrogenasa	30	3,35	36,95
(R)-2	> -99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa & LK-alcohol- dehidrogenasa	30	n.d.	-40,21
(R)-3	> -99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa & LK-alcohol- dehidrogenasa	30	2,57	-32,19
(S)-4	> 99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa & LK-alcohol- dehidrogenasa	30	23,12	> 99,9
(R)-5	> -99,9	RE-alcohol- dehidrogenasa & LK-alcohol- dehidrogenasa	30	5,74	-23,92
^a Los valores e.e. positivos o bien negativos se refieren al exceso del enantiómero correspondiente (S) o bien (R). ^b e.e. al cabo de un tiempo de reacción de 48 horas					

ES 2 328 417 T3

Analítica

Análisis por cromatografía gaseosa (GC)

5 Cromatografía gaseosa: cromatógrafo de gas Varian 3900 (FID)

Columna: Chrompack Chirasil-DEX CB (25 m x 0,32 mm x 0,25 μ m, 1,0 bar de H₂)

10	Substrato	Columna para la GC	Programa de temperatura ^a	Tiempo de retención [min]	e.e. ^b [%]
15				(S) 1,369	> 99,9
20	2	Chirasil-DEX CB	110/0/2,5/120/0/10/200/0	(R) 1,434	< - 99,9
25				Cetona n.d.	-
30				(S) 2,741	> 99,9
35	3	Chirasil-DEX CB	110/0/2,5/120/0/10/200/0	(R) 2,988	< - 99,9
40				Cetona 1,795	-
45				(S) 3,683	> 99,9
50	4	Chirasil-DEX CB	110/0/2,5/120/0/10/200/0	(R) n.d.	< - 99,9
55				Cetona 2,65	-
60				(S) 1,860	> 99,9
	5	Chirasil-DEX CB	110/0/2,5/120/0/10/200/0	(R) 1,981	< - 99,9
				Cetona 1,303	-
	^a ° C/tiempo de retención [min]/velocidad de calentamiento [°C/min]/° C/tiempo de retención/velocidad de calentamiento/°C/ tiempo de retención [min], ^b Los valores e.e. positivos o bien negativos se refieren al exceso del enantiómero correspondiente (S) o bien (R). n.d.: no detectable Acetilación de alcoholes (método general)				

65 La derivatización se llevó a cabo mediante la adición de 100 μ l de solución de anhídrido de acético/DMAP e incubación a 30°C/130 revoluciones por minuto, durante 60 minutos. Se añadieron 0,5 ml de H₂O. La fase orgánica se desprendió y se secó sobre Na₂SO₄.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la racemización de alcoholes secundarios, ópticamente activos, mediante incubación de estos alcoholes con, al menos, un alcohol-dehidrogenasa de la clase E.C. 1.1.1.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como alcohol-dehidrogenasa se emplea una alcohol-dehidrogenasa microbiana.

10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como alcohol-dehidrogenasa se emplea una alcohol-dehidrogenasa procedente de un microorganismo del género Lactobacillus o Rhodococcus.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como alcohol-dehidrogenasa se emplea una mezcla de dos alcohol-dehidrogenasas.

15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque una de las alcohol-dehidrogenasas presenta una especificidad Prelog y la otra alcohol-dehidrogenasa presenta una especificidad anti-Prelog.

20 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la incubación puede tener lugar en ausencia de disolventes orgánicos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65