



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 264 981**

⑯ Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

C07C 69/675 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C07D 319/04 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01925699 .9**

⑯ Fecha de presentación : **01.05.2001**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1282719**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

⑯ Título: **Procedimiento para la preparación de dihidroxíesteres y sus derivados.**

⑯ Prioridad: **09.05.2000 GB 0011120**

⑯ Titular/es: **AstraZeneca UK Limited
15 Stanhope Gate
London, Greater London W1K 1LN, GB**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **01.02.2007**

⑯ Inventor/es: **Holt, Robert, Antony;
Blacker, Andrew, John y
Reeve, Christopher, David**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.02.2007**

⑯ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 264 981 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

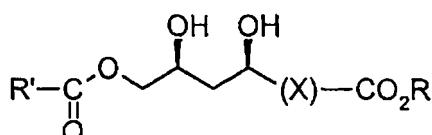
Procedimiento para la preparación de dihidroxiésteres y sus derivados.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento estereoselectivo para la preparación de dihidroxiésteres, y sus derivados.

10 La reducción microbiana del éster etílico del ácido 3,5-dioxo-6-(benciloxi)-hexanoico, para dar ácido 3,5-dihidroxi-6-(benciloxi)hexanoico, se describe en el documento EP 0569998 y en Enzyme and Microbial Technology, 1993, Vol. 15, 1014-1021 (Patel *et al*). En el documento WO 97/00968 se describe la reducción microbiana de 6-ciano-5-hidroxi-3-on-hexanoatos para dar los correspondientes 6-ciano-3,5-dihidroxi-hexanoatos de alquilo.

15 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (1)

15

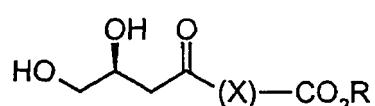


Fórmula (1)

25 que comprende

- a) reducir estereoselectivamente un compuesto de fórmula (2)

30

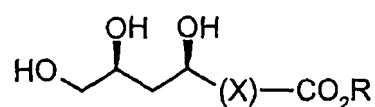


Fórmula (2)

35

para producir un compuesto de fórmula (3),

40



Fórmula (3)

45

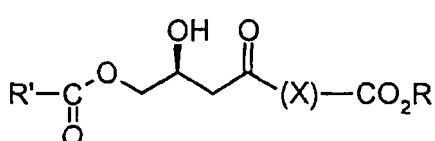
y

50 b) esterificar el compuesto de fórmula (3) en presencia de un compuesto de fórmula R''-O-COR' y de una enzima de lipasa o hidrolasa, para formar de ese modo el compuesto de fórmula (1); o

- c) esterificar un compuesto de fórmula (2) en presencia de un compuesto de fórmula R''-O-COR' y de una enzima de lipasa o hidrolasa, para formar de ese modo el compuesto de fórmula (4),

55

60



Fórmula (4)

65

y

- d) reducir estereoselectivamente un compuesto de fórmula (4) para producir un compuesto de fórmula (1)

en las que

X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo opcionalmente sustituido,

5 R y R" representan, cada uno, un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

10 Los grupos hidrocarbilo representados por X, R, R' o R" pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes, y pueden estar persustituidos, por ejemplo perhalogenados. Los ejemplos de sustituyentes incluyen halo, especialmente fluoro y cloro, alcoxi, tal como alcoxi C₁₋₄, y oxo.

15 Preferiblemente, X representa un grupo de fórmula -(CH₂)_n- en la que n es de 1 a 4, y lo más preferible X representa un grupo de fórmula -CH₂-.

R" puede ser un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C₁₋₆, o un grupo alquilcarbonilo, tal como un grupo alquil C₁₋₆-carbonilo, por ejemplo un grupo CH₃(C=O)- o CF₃(C=O)-. R" es lo más preferible un grupo vinilo o isopropenilo.

20 R representa preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₆, que puede ser lineal o ramificado, y puede estar sustituido con uno o más sustituyentes. Lo más preferible, R representa un grupo t-butilo.

25 R' puede representar un alquilo sustituido, a menudo un alquilo C₁₋₆, tal como un grupo CF₃- o CF₃CH₂-, pero es preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₆ no sustituido, y de modo muy especial es un grupo metilo.

La reducción estereoselectiva de los compuestos de fórmulas (2) o (4) emplea preferiblemente métodos de reducción química o microbiana, tal como hidrogenación, hidrogenación de transferencia, reducción con hidruro metálico o deshidrogenasas. Los ejemplos de un procedimiento de hidrogenación adecuado, tal como el descrito en Helv. Chim.

30 Acta 69, 803, 1986, incluyen el uso de entre 0,01 y 10% (p/p) de catalizadores tales como platino, paladio o rodio, sobre soportes heterogéneos tales como carbón, alúmina, sílice, usando hidrógeno molecular a una presión entre 1 y 10 bares, en un disolvente tal como metanol, etanol, t-butanol, dimetilformamida, t-butilmetiléter, tolueno o hexano. Como alternativa, se pueden usar catalizadores de hidrogenación homogéneos, tales como los descritos en el documento EP0583171.

35 Los ejemplos de procedimientos de hidrogenación por transferencia química adecuados incluyen los descritos en Zassinovich, Mestroni y Gladiali, Chem. Rev. 1992, 92, 1051, o por Fuji *et al* en J. Am. Chem. Soc. 118, 2521, 1996. Los procedimientos de hidrogenación por transferencia química preferidos emplean complejos ligados quirales de metales de transición, tales como rutenio o rodio, especialmente complejos de rutenio aromáticos neutros ligados con diaminas quirales. Preferiblemente, tal hidrogenación por transferencia química emplea un ácido, especialmente una sal de formiato tal como formiato de trietilamonio, como fuente de hidrógeno.

40 Se pueden usar reactivos de tipo hidruro metálico, tales como los descritos en Tet. 1993, 1997, Tet. Asymm. 1990, 1, 307, o J. Am. Chem. Soc. 1998, 110, 3560.

45 Los ejemplos de reducciones microbianas adecuadas incluyen poner en contacto el compuesto de fórmula (2) o (4) con un organismo que posea las propiedades de un microorganismo seleccionado de Beauveria, preferiblemente *Beauveria bassiana*, Pichia, preferiblemente *Pichia angusta* o *Pichia pastoris*, *trehalophila*, *haplophila* o *membranefaciens*, Candida, preferiblemente *Candida humicola*, *solani*, *guillermondii*, *diddensiae* o *friedrichii*, Kluyveromyces, preferiblemente *Kluyveromyces drosophilicola*, o *Torulaspora*, preferiblemente *Torulaspora hansenii*. La reducción se puede lograr poniendo en contacto los compuestos de fórmulas (2) o (4) con una enzima extraída de los microorganismos anteriores. Lo más preferible, los compuestos de fórmulas (2) o (4) se ponen en contacto con un microorganismo seleccionado de *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guillermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosophilicola* y *Torulaspora hansenii*, o un extracto de los organismos anteriores.

55 La invención comprende preferiblemente producir un compuesto de fórmula (3) reduciendo selectivamente un compuesto de fórmula (2) usando células completas de, o extractos procedentes de, los microorganismos mencionados anteriormente, preferiblemente *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guillermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosophilicola* y *Torulaspora hansenii*.

60 La invención se lleva a cabo de forma muy preferible usando células completas de los organismos, ya que esto evita la necesidad de separar las enzimas deseadas, y proporciona cofactores para la reacción.

65 Se puede usar cualquiera de las especies anteriores, pero en muchas realizaciones se ha encontrado que se pueden lograr conversiones elevadas y una elevada selectividad mediante el uso de la enzima o células completas de *Pichia angusta*.

ES 2 264 981 T3

En general, con las enzimas se usa un cofactor, normalmente NAD(P)H (nicotinamida adenina dinucleótido o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y un sistema para regenerar el cofactor, por ejemplo glucosa y glucosa deshidrogenasa, para que la reacción se lleve a cabo. Ya que los cofactores y los mecanismos de reducción adecuados están presentes en las células completas, se prefiere usar las células completas en un medio nutriente que contiene 5 preferiblemente una fuente de carbono adecuada, que puede incluir uno o más de los siguientes: un azúcar, por ejemplo maltosa, sacarosa o preferiblemente glucosa, un poliol, por ejemplo glicerol o sorbitol, ácido cítrico, o un alcohol inferior, por ejemplo metanol o etanol.

Si se pretende que las células completas crezcan durante la reacción, debe haber en el medio fuentes de nitrógeno 10 y de fósforo y oligoelementos. Estos pueden ser los usados normalmente en el cultivo del organismo.

El procedimiento se puede llevar a cabo añadiendo un compuesto de fórmula (2) o (4) a un cultivo del organismo en crecimiento, en un medio capaz de mantener el crecimiento, o a una suspensión de las células vivas en un medio que contiene preferiblemente una fuente de carbono pero que carece de uno o más nutrientes necesarios para el crecimiento. 15 También se pueden usar células muertas, con tal de que estén presentes las enzimas y los cofactores necesarios; si es necesario, se pueden añadir a las células muertas.

Si se desea, las células se pueden inmovilizar sobre un soporte que está en contacto con el compuesto de fórmula 20 (2) o (4), preferiblemente en presencia de una fuente de carbono adecuada como se ha descrito previamente.

El pH es adecuadamente 3,5 a 9, por ejemplo 4 a 9, preferiblemente como máximo 6,5 y lo más preferible como 25 máximo 5,5. Se usa muy adecuadamente un pH de 4 a 5. El procedimiento se puede llevar a cabo adecuadamente a una temperatura de 10 hasta 50°C, preferiblemente 20 hasta 40°C, y más preferiblemente 25 hasta 35°C. Se prefiere operar en condiciones aerobias si están presentes células completas de los organismos mencionados anteriormente. Adecuadamente, se emplea, en las condiciones mencionadas anteriormente de pH y de temperatura, una velocidad de aireación equivalente a 0,01 hasta 1,0 volúmenes de aire, medido a temperatura y presión estándares, por volumen del medio de cultivo por minuto, pero se apreciará que es posible una variación considerable. Se pueden usar pH, temperatura y condiciones de aireación similares durante el crecimiento de los organismos si éste se lleva a cabo separadamente del procedimiento.

30 Las enzimas purificadas se pueden aislar por medios conocidos, adecuadamente centrifugando una suspensión de células desintegradas, y separando una disolución clara del desecho, separando la enzima deseada de la disolución, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico, adecuadamente con elución a partir de la columna con un líquido de fuerza iónica creciente, y/o mediante precipitación selectiva mediante adición de un material iónico, por ejemplo sulfato de amonio. Si se desea, tales operaciones se pueden repetir para potenciar la pureza.

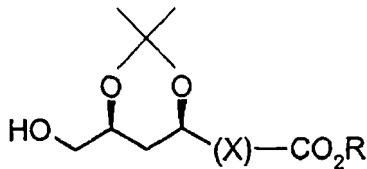
En la esterificación de los compuestos de fórmula (2) o (3), se prefiere transesterificar con otro éster, que esté 40 presente en al menos una equivalencia en moles con respecto al alcohol, y es adecuadamente un éster vinílico (ya que el subproducto, el acetaldehído, no está implicado en una retroreacción). Como alternativa, se puede usar un anhídrido, tal como anhídrido acético o anhídrido trifluoroacético, o un éster, tal como acetato de etilo, o un éster fluorado, 45 tal como acetato de trifluoroetilo. Se prefiere que la reacción de esterificación regioespecífica se lleve a cabo en un disolvente orgánico que contiene menos de 1% (p/p) de agua, tal como acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano, terc-butilmetyléter, tolueno, butanona, pentanona o hexanona, a una temperatura preferiblemente de 20 hasta 75°C, más preferiblemente 25 hasta 50°C. Los ésteres son preferiblemente ésteres de ácidos alcanoicos inferiores que tienen 2 a 8 átomos de carbono, o sus derivados sustituidos. Opcionalmente se puede emplear una atmósfera inerte, por ejemplo se puede hacer pasar un caudal de nitrógeno a través de la disolución.

Las enzimas se pueden proporcionar como tales o como células completas que las contienen. Se prefiere que se 50 inmovilicen para facilitar su separación del producto, y, si se desea, su reutilización.

Las enzimas preferidas incluyen lipasas tales como lipasa pancreática porcina, lipasa de *Candida cylindracea*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, fracción B de *Candida antarctica* tal como la disponible con el nombre comercial Chirazyme L2, aquellas de *Humicola lanuginosa*, por ejemplo la vendida con el nombre comercial Lipolase, o aquellas de *Pseudomonas*, por ejemplo las vendidas con el nombre comercial SAM II, y más preferiblemente aquellas de 55 *Candida antarctica*, por ejemplo la vendida con el nombre comercial Chirazyme.

Los compuestos de fórmula (1), en la que R' es CH₃, R es hidrocarbilo opcionalmente sustituido, X es -(CH₂)_n- y n es 1 a 4, forman un tercer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, R es t-butilo, y lo más preferible X es -CH₂-.

60 Los compuestos de fórmula (1) son intermedios útiles para la preparación de compuestos farmacéuticos. Habitualmente, se hacen reaccionar con un grupo protector para restos 1,3-dihidroxi, tal como 2,2-dimetoxipropano, para formar un acetónido como se describe en Synthesis 1998, 1713. El grupo R'-(C=O)- se puede eliminar después selectivamente mediante tratamiento con una disolución alcohólica débilmente básica, por ejemplo disolución de K₂CO₃ como se describe en el documento US 5.278.313, o una lipasa en disolución acuosa o en una disolución orgánica que contiene suficiente agua para mantener la hidrólisis, para formar un compuesto de fórmula (5):



Fórmula (5)

10 Ejemplo 1

Preparación de (3R,5S)-3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo

En un matraz de fondo redondo de 250 ml, agitado, se cargaron 20 ml de acetonitrilo, 0,405 g (0,662 mmoles) de di-mu-clorobis[(p-cimeno)clororruenio (II)] y 0,492 g (1,34 mmoles) de (1S,2S)-(+)-N-(4-toluenosulfonil)-1,2-difениtilendiamina. La disolución se desoxigenó rociándola con nitrógeno y manteniendo después un tubo de irrigación. A la vasija de reacción se cargó una disolución desoxigenada de 26 g (0,119 moles) de (5S)-3-ceto-5,6-dihidroxihexanoato de t-butilo en 15 ml de acetonitrilo, y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se añadieron 65 ml de una mezcla 5:2 (mol/mol) de ácido fórmico destilado y trietilamina, durante un período de 10 minutos, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. A esta disolución se añadieron lentamente 80 ml de diclorometano y 120 ml de bicarbonato sódico saturado. A la capa acuosa se cargaron 70 g de cloruro de amonio, y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se lavó tres veces más con 90 ml de acetato de etilo, las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, y se eliminó el disolvente para dar 21,1 g de un aceite bruto que contiene principalmente (3R,5S)-3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo. La relación de diastereómeros se determinó mediante RMN ^{13}C , la cual era 5,2:1 (3R:5S):(3S:5S). El material se usó bruto en la siguiente reacción, pero se podía haber purificado mediante cromatografía en columna.

Preparación de (3R,5S)-6-acetoxi-3,5-dihidroxihexanoato de t-butilo

30 A un matraz de fondo redondo de 1 l, agitado, se cargaron 700 ml de tetrahidrofurano y 70,7 g (0,32 moles) de (3R,5S)-3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo, 41 ml (0,46 moles) de acetato de vinilo y 6,3 g de la lipasa soportada Chirazyme L2TM. Después de agitar 3 horas a temperatura ambiente, la lipasa se eliminó mediante tamizado, y los volátiles se eliminaron mediante destilación a vacío. La masa de aceite bruto fue 78,7 g, y se determinó que el componente principal era (3R,5S)-6-acetoxi-3,5-dihidroxihexanoato de t-butilo. Este material se usó directamente en la siguiente etapa.

Preparación de éster 1,1-dimetiletilílico del ácido (4R,6S)-6-[(acetiloxi)metil]-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4-acético

40 A un matraz de fondo redondo de 1 litro, agitado, se cargaron 78,7 g de (3R,5S)-6-acetoxi-3,5-dihidroxihexanoato de t-butilo, 800 ml de 2,2-dimetoxipropano y 5,7 g de ácido p-toluenosulfónico. Después de 35 minutos, la masa de reacción se concentró hasta la mitad de su volumen, y se añadieron 300 ml de diclorometano y 300 ml de bicarbonato sódico 1 M. La capa orgánica se separó, y la capa acuosa se lavó tres veces más con 150 ml de acetato de etilo. Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, y los volátiles se eliminaron mediante destilación a vacío. Se obtuvieron 92 g de un aceite bruto. Éste se purificó primero haciéndolo pasar a través de una columna corta de sílice ultrarrápida y eluyendo con hexano y después hexano:acetato de etilo 85:15 (v/v), y después cristalizando el material 3 veces en hexano para dar 22,17 g de éster 1,1-dimetiletilílico del ácido (4R,6S)-6-[(acetiloxi)metil]-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4-acético, que se determinó que, mediante GC quiral, tenía un 99,9% de.

Preparación de éster 1,1-dimetiletilílico del ácido (4R,6S)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4-acético

50 A un matraz de fondo redondo agitado, de 500 ml, se cargaron 22,17 g de éster 1,1-dimetiletilílico del ácido (4R,6S)-6-[(acetiloxi)metil]-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4-acético, 250 ml de metanol y 5,05 g de carbonato potásico triturado. La reacción se agitó durante 35 minutos hasta que la hidrólisis estuvo terminada, y después el carbonato potásico se eliminó mediante tamizado, la masa de la reacción se concentró, y se añadieron 150 ml de salmuera al 5% (p/p) y 150 ml de tolueno. La capa orgánica se separó, y la capa acuosa se lavó dos veces más con 250 ml de tolueno. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron tres veces con salmuera al 15% (p/p), y el disolvente se eliminó mediante destilación a vacío para dar 17,78 g de un aceite claro, que se determinó que era >99% de éster 1,1-dimetiletilílico del ácido (4R,6S)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4-acético.

60 Ejemplo 2

Preparación de (5S)-6-acetoxi-5-hidroxi-3-cetohexanoato de terc-butilo

65 A un matraz de fondo redondo de 250 ml, agitado, se cargaron 2,32 g (0,0106 moles) de (5S)-5,6-dihidroxihexanoato de terc-butilo, 40 ml de tetrahidrofurano, 0,98 ml (0,0106 moles) de acetato de vinilo y 0,22 g de la lipasa soportada Chirazyme L2TM. Después de 20 minutos, la lipasa se eliminó mediante tamizado, y los volátiles se eliminaron mediante destilación a vacío, para dar 2,96 g de un aceite bruto que se caracterizó mediante RMN como (5S)-6-acetoxi-5-hidroxi-3-cetohexanoato de terc-butilo.

Ejemplo 3

Preparación de (3R,5S)-3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo

5 Se hizo crecer *Pichia angusta* NCYC R230 (depositada bajo las provisiones del Tratado de Budapest el 18 de mayo de 1995) en un sistema multifermentador Braun Biostat Q en el siguiente medio (por litro): glucosa, 40 g; MgSO₄, 1,2 g; K₂SO₄, 0,21 g; KH₂PO₄, 0,69 g; H₃PO₄ (concentrado), 1 ml; extracto de levadura (Oxoid), 2 g; FeSO₄.7H₂O, 0,05 g; antiespumante (EEA 142 Foammaster), disolución de oligoelementos, 1 ml (esta disolución contenía, por litro, CuSO₄.5H₂O, 0,02 g; MnSO₄.4H₂O, 0,1 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,1 g; CaCO₃, 1,8 g).

10 Cada uno de los 4 fermentadores se cargó con 250 ml de medio, y se esterilizó sometiéndolos a autoclave. El pH se ajustó a 4,5 usando disolución 7 molar de hidróxido amónico, la temperatura se ajustó a 28°C, el caudal de aire se ajustó a 300 ml/minuto, y la velocidad del agitador se ajustó a 1200 rpm. Los fermentadores se inocularon con células tomadas de placas de agar (agar al 2%) que comprenden el mismo medio como se ha descrito 15 anteriormente, excepto que la concentración de glucosa fue 20 g/litro. Después de 22 horas de crecimiento en los fermentadores, se inició la reacción de biorreducción mediante la adición de (5S)-3-ceto-5,6-dihidroxihexanoato de t-butilo; dos de los fermentadores se cargaron con 3,75 ml cada uno, y los otros dos se cargaron con 5 ml cada uno.

20 La reacción se continuó durante otras 78 horas hasta la conversión del 100% del sustrato. Durante este período, el cultivo se alimentó con una disolución al 50% de glucosa, a una tasa de 1-3 gramos de glucosa/litro de cultivo/hora, para mantener la viabilidad celular y proporcionar una fuente de energía reductora. Las reacciones se terminaron al eliminar las células mediante centrifugación. Al sobrenadante recuperado, libre de células, se añadió cloruro de sodio hasta una concentración final de 20% p/v, y la mezcla se extrajo tres veces con un volumen igual de acetonitrilo. Los 25 extractos reunidos de acetonitrilo se secaron con sulfato sódico anhidro, y el disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador giratorio (temperatura del baño de agua 45°C) para producir un aceite amarillo pálido viscoso. Se confirmó que la identidad del producto de cada reacción era (3R,5S)-3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo, y en la tabla más abajo se da el exceso diastereomérico de cada una de las muestras.

30 experimento	exceso diastereomérico (%)
1	99,6
2	99,6
3	99,4
40 4	99,6

Ejemplo 4

Preparación de (3R,5S)-3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo

45 Se hizo crecer *Pichia angusta* NCYC R320 (depositada bajo las provisiones del Tratado de Budapest el 18 de mayo de 1995) en un sistema multifermentador Braun Biostat Q en el siguiente medio (que contiene, por litro): glucosa, 20 g; sulfato de amonio, 10 g; extracto de levadura (Oxoid), 2 g; MgSO₄.7H₂O, 1,2 g; KH₂PO₄, 0,69 g; K₂SO₄, 0,21 g; FeSO₄.7H₂O, 0,05 g; H₃PO₄ (concentrado), 1 ml; antiespumante EEA 142 "foammaster", 0,5 ml; disolución de oligoelementos, 1 ml (esta disolución contenía, por litro, Ca(CH₃CO₂)₂, 2,85 g, ZnSO₄.7H₂O, 0,1 g; MnSO₄.H₂O, 0,075 g; CuSO₄.5H₂O, 0,02 g; ácido sulfúrico (concentrado), 1 ml).

55 Un fermentador se cargó con 250 ml de medio, y se esterilizó sometiéndolo a autoclave. El pH se ajustó a 5,0 usando disolución 2 molar de hidróxido sódico. La temperatura se ajustó a 28°C, el caudal de aire se ajustó a 250 ml minuto⁻¹, y la velocidad del agitador se ajustó a 1200 rpm. El fermentador se inoculó con 2,5 ml de una suspensión de células en agua desionizada estéril, preparada en una placa de agar de *Pichia angusta* NCYC R320. Después de 17 horas de crecimiento, se inició la biorreducción mediante adición de 6,36 g de (5S)-3-ceto-5,6-dihidroxihexanoato 60 de t-butilo como una disolución acuosa. Al mismo tiempo, se inició una alimentación de glucosa al fermentador, a un caudal de 2 g de glucosa l⁻¹ h⁻¹.

La reacción se continuó durante otras 78 horas, en cuyo punto se había logrado el 96% de conversión del sustrato. El material de partida y el producto se detectaron mediante HPLC (columna Hichrom S5 CN-250A, temperatura 35°C, 65 fase móvil: TFA acuoso (0,1%):acetonitrilo 95:5, caudal 1 ml min⁻¹, volumen de inyección 5 ml, detector de índice de refracción).

ES 2 264 981 T3

La reacción se terminó eliminando las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 20 minutos. El pH del sobrenadante recuperado, libre de células, se ajustó a 7,5 usando NaOH 2 M. Se disolvió MgSO₄.1,6H₂O (15% p/v basándose en anhidro) en el sobrenadante libre de células, y la disolución resultante se extrajo dos veces con un volumen igual de 2-pentanona. Las fases del disolvente se recogieron, y el disolvente se eliminó a presión reducida en

- 5 un evaporador giratorio a 45°C produciendo un aceite viscoso naranja. Éste se redisolvió en 50 ml de 2-pentanona seca destilada, y nuevamente el disolvente se eliminó mediante evaporación giratoria para dar 3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo (5,08 g, 80% de rendimiento aislado). El exceso diastereomérico se determinó según lo siguiente: se derivatizó una muestra de 3,5,6-trihidroxihexanoato de t-butilo (30 mg) mediante reacción durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente en un exceso de anhídrido trifluoroacético; el anhídrido en exceso se eliminó en una
- 10 corriente de nitrógeno seco, y el aceite residual se diluyó con diclorometano (1 ml). La mezcla se analizó usando una columna Chiralcel Dex CB (25 metros), a una temperatura de 140°C (isotérmica). Los diastereómeros eluyeron a 14,4 minutos (diastereómero 3R,5S) y 15,7 minutos (diastereómero 3S,5S). Se encontró que el exceso diastereomérico de la muestra, mediante este método, era 99,7%.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

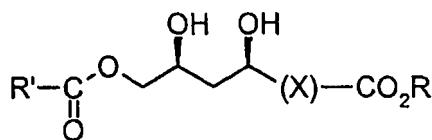
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (1)

5

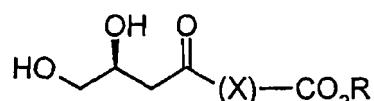


Fórmula (1)

15 que comprende

- a) reducir estereoselectivamente un compuesto de fórmula (2)

20

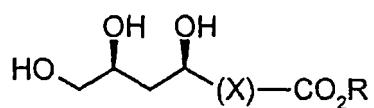


Fórmula (2)

25

para producir un compuesto de fórmula (3),

30



35

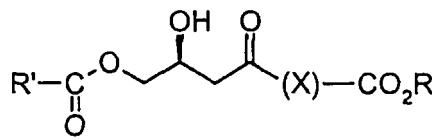
Fórmula (3)

y

40

- b) esterificar el compuesto de fórmula (3) en presencia de un compuesto de fórmula R''-O-COR' y de una enzima de lipasa o hidrolasa, para formar de ese modo el compuesto de fórmula (1); o
- c) esterificar un compuesto de fórmula (2) en presencia de un compuesto de fórmula R''-O-COR' y de una enzima de lipasa o hidrolasa, para formar de ese modo el compuesto de fórmula (4),

45



Fórmula (4)

55

- d) reducir estereoselectivamente un compuesto de fórmula (4) para producir un compuesto de fórmula (1)

en las que

60

X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo opcionalmente sustituido,

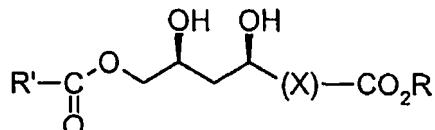
R y R'' representan, cada uno independientemente, un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que X representa un grupo de fórmula -CH₂-.

ES 2 264 981 T3

3. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que R" representa un grupo vinilo o isopropieno.
4. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que R' representa un grupo alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que R' representa un grupo metilo.
6. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que los compuestos de fórmulas (2) o (4) se reducen poniéndolos en contacto con un organismo que posee las propiedades de un microorganismo seleccionado de los géneros Beauveria, Pichia, Candida, Kluyveromyces o Torulaspora, o una enzima extraída de ellos.
7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que los compuestos de fórmulas (2) o (4) se reducen poniéndolos en contacto con un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guillermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosopliarum* y *Torulospora hansenii*, o una enzima extraída de ellos.
8. Un procedimiento según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que se emplean células completas.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 u 8, en el que los compuestos de fórmulas (2) o (4) se reducen a un pH desde 4 hasta 5.
10. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que los compuestos de fórmula (2) o (3) se esterifican en presencia de una enzima seleccionada del grupo que consiste en lipasa pancreática porcina, lipasa de *Candida cylindracea*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, la fracción B de *Candida antarctica*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.
11. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el compuesto de fórmula R"-O-COR' es acetato de vinilo.
12. Un compuesto de fórmula (1):

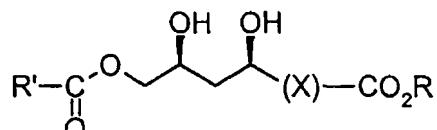


40 Fórmula (1)

en la que R' es CH₃, R es hidrocarbilo opcionalmente sustituido, X es -(CH₂)_n- y n es 1 a 4.

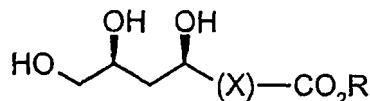
13. Un compuesto según la reivindicación 12, en el que R es t-butilo, y X es -CH₂-.

45 14. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (1)



55 Fórmula (2)

que comprende esterificar un compuesto de fórmula (3)



65 Fórmula (3)

en presencia de un compuesto de fórmula R"-O-COR' y de una enzima de lipasa o hidrolasa, para formar de ese modo el compuesto de fórmula (1);

ES 2 264 981 T3

en las que

X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo opcionalmente sustituido,

5 R y R" representan cada uno independientemente un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

10 15. Un procedimiento según la reivindicación 14, en el que R' es CH₃, R es t-butilo y X es -CH₂-.

16. Un procedimiento según la reivindicación 14 o según la reivindicación 15, en el que R" es un grupo vinilo o isopropenilo.

15 17. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en lipasa pancreática porcina, lipasa de *Candida cylindracea*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, la fracción B de *Candida antarctica*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65