



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 229**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06723073 .0**

96 Fecha de presentación : **21.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1851322**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos.**

30 Prioridad: **21.02.2005 AT A 285/2005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2010

73 Titular/es: **IEP GmbH**
Rheingastrasse 190-196
65203 Wiesbaden, DE

72 Inventor/es: **Gupta, Antje;**
Bobkova, Maria y
Tschentscher, Anke

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 335 229 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 reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos, especialmente de ésteres del ácido 4-halo-3-oxobutírico para dar los correspondientes R-alcoholes o ésteres del ácido S-4-halo-3-hidroxi-butírico.

10 Las carbonil reductasas (otras denominaciones: alcohol deshidrogenasas, óxido reductasas) se conocen como catalizadores para la reducción de compuestos de carbonilo o para la oxidación de alcoholes secundarios. Estas enzimas necesitan una coenzima, por ejemplo NAD(P)H. La reducción de cetonas con la carbonil reductasa obtenida de *Lactobacillus kefir* y la coenzima NADPH se conoce por ejemplo por el documento US 5.342.767.

15 Los hidroxicompuestos ópticamente activos son unidades estructurales quirales valiosas con amplia aplicación para la síntesis de compuestos farmacológicamente eficaces, sustancias aromáticas, feromonas, productos agroquímicos e inhibidores enzimáticos. Los ésteres del ácido S-4-halo-3-hidroxi-butírico son por ejemplo productos intermedios importantes para la síntesis de inhibidores de la HMG-CoA reductasa, D-carnitina y otros.

20 Se conocen enzimas enantioselectivas, que por ejemplo pueden reducir ésteres del ácido 4-halo-3-oxobutírico para dar los correspondientes ésteres del ácido S-4-halo-3-hidroxi-butírico. Como ejemplos pueden mencionarse:

reductasas de levadura de panadería (D-enzyme-1, D-enzyme-2, J. Am. Chem. Soc. 107, 2993-2994, 1985);

25 aldehído reductasa 2 de *Sporobolomyces salmonicolor* (Appl. Environ. Microbiol. 65, 5207-5211, 1999);

éster del ácido cetopantoténico reductasa de *Candida macedoniensis* (Arch. Biochem. Biophys. 294, 469-474, 1992);

30 reductasa de *Geotrichum candidum* (Enzyme Microb. Technol. 14, 731-738, 1992);

carbonil reductasa de *Candida magnoliae* (documento WO 98/35025);

carbonil reductasa de *Kluyveromyces lactis* (documento JP-A Hei 11-187869);

35 proteína portadora de β -cetoacil-acilo reductasa de la ácido graso sintetasa tipo II (documento JP-A 2000-189170);

(R)-2-octanol deshidrogenasa de *Pichia finlandica* (documento EP 1179595 A1);

40 alcohol deshidrogenasas secundarias R-específicas de organismos del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus kefir* (documento US5200335), *Lactobacillus brevis* (documento DE 19610984 A1) (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. Diciembre de 2000; 56 Pt 12: 1696-8), *Lactobacillus minor* (documento DE10119274); *Pseudomonas* (documento US 05385833) (Appl Microbiol Biotechnol. Agosto de 2002; 59(4-5):483-7. publicación electrónica del 26 de junio de 2002, J. Org. Chem. 1992, 57, 1532).

45 A excepción de las enzimas de *Pseudomonas*, de *Lactobacillus* y de *Pichia finlandica* (documento EP 1179595 A1) las enzimas conocidas en la mayoría de los casos no aceptan ningún alcohol secundario como sustrato y tampoco catalizan la oxidación de alcoholes secundarios.

50 Por tanto, en un proceso de reducción enzimático industrial estas enzimas deben acoplarse a una enzima adicional responsable de la regeneración del cofactor NADH o NADPH. Tales enzimas adecuadas para la regeneración de NAD(P)H son formiato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, que preferiblemente se expresan junto con la enzima para la reducción de ésteres del ácido 4-halo-3-oxobutírico.

55 Pudo demostrarse que las células recombinantes de *Escherichia coli*, que por ejemplo expresan simultáneamente el gen para la carbonil reductasa de *Candida magnoliae*, así como el gen para la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium*, pueden utilizarse de manera eficaz en el sistema bifásico acuoso/orgánico, lográndose concentraciones de sustrato de > 40% (porcentaje en peso) (Appl Microbiol Biotechnol (2001), 55; 590-595, Ann N Y Acad Sci. 13 de diciembre de 1998; 864:87-95).

60 Procesos con enzimas del grupo de los *Lactobacillales* (*Lactobacillus minor*; documento DE 10119274) se han realizado hasta la fecha satisfactoriamente con regeneración de coenzima acoplada a sustrato con 2-propanol, realizándose la reducción de sustratos insolubles también en altas concentraciones mediante la utilización de sistemas bifásicos acuosos/orgánicos (documentos US 5342767, DE10119274).

65 Básicamente en la aplicación de la regeneración de coenzima acoplada con sustrato con 2-propanol o 2-butanol se consideró la tolerancia reducida de la mayoría de las enzimas con respecto al 2-propanol y 2-butanol como limitativa. Habitualmente se utilizan concentraciones de 2-propanol claramente inferiores al 10% en volumen.

ES 2 335 229 T3

En el estado de la técnica no se conoce ningún procedimiento que describa el uso de óxido reductasas R-específicas de levaduras con regeneración de coenzima acoplada con sustrato con 2-propanol y/o 2-butanol.

5 Mediante la utilización limitada del cosustrato 2-propanol se consiguieron sólo tasas de conversión y concentraciones de sustrato insatisfactorias (Angew Chemie Int Ed Engl 2002, 41: 634-637, Biotechnol Bioeng 5 de abril de 2004; 86 (1): 55-62).

10 En el documento EP 1 179 595 A se describe un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos de carbonilo, en el que se utilizan el compuesto de carbonilo en una concentración del 0,1-90% y el cosustrato glucosa, formiato, etanol o 2-propanol en un exceso de 1-20 veces.

15 El documento WO 02/086126 A enseña un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos de carbonilo, en el que la óxido reductasa S o R-específica, el cofactor NAD(P)H y el compuesto de carbonilo se incuban en un sistema de 2 fases.

20 El documento WO 2004/111083 A y el documento WO 03/078615 A describen procedimientos para la producción de hidroxicompuestos, reduciéndose compuestos de carbonilo con NADH como cofactor y 2-propanol o 2-butanol como cosustrato por medio de una óxido reductasa S-específica de *Pichia capsulata* o *Rhodococcus* para dar los correspondientes S-hidroxicompuestos.

25 Recientemente pudo aislarse una alcohol deshidrogenasa de cadena mediana, S-específica de *Rhodococcus ruber*, que también es todavía estable y activa a concentraciones considerablemente mayores de 2-propanol del 50-80% (porcentaje en volumen). (Biotechnol Bioeng 5 de abril de 2004; 86 (1): 55-62), documento WO 03/078615).

La invención tiene como objetivo superar estos inconvenientes y se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos de fórmula general I



30 en la que R_1 representa uno de los restos

1) -alquilo (C_1-C_{20}), siendo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada,

35 2) -alqueno (C_2-C_{20}), siendo alqueno de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene hasta cuatro dobles enlaces,

40 3) -alquino (C_2-C_{20}), siendo alquino de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene hasta cuatro triples enlaces,

4) -arilo (C_6-C_{14}),

5) -alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}),

45 6) -heterociclo (C_5-C_{14}), que está no sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, NO_2 y/o $-NH_2$, o

7) -cicloalquilo (C_3-C_7),

50 en la que los restos mencionados anteriormente bajo 1) a 7) están no sustituidos o están mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

y R_2 representa uno de los restos

8) -alquilo (C_1-C_6), siendo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada,

55 9) -alqueno (C_2-C_6), siendo alqueno de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene hasta tres dobles enlaces,

60 10) -alquino (C_2-C_6), siendo alquino de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene dos triples enlaces, o

11) -alquil (C_1-C_{10})-C(O)-O-alquilo (C_1-C_6), siendo alquilo lineal o de cadena ramificada y está no sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

65 en la que los restos mencionados anteriormente bajo 8) a 11) están no sustituidos o están mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

que está caracterizado porque

ES 2 335 229 T3

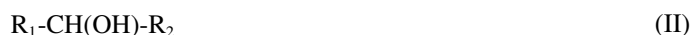
una mezcla monofásica líquida que comprende

(a) al menos el 5% en peso/volumen de un compuesto de fórmula (I),

5 (b) al menos el 15% en volumen de 2-propanol y/o 2-butanol, y

(c) agua

10 se trata con una óxido reductasa R-específica en presencia de un cofactor, para formar un hidroxicompuesto quiral de fórmula general II



15 en la que R_1 y R_2 tienen el significado indicado anteriormente, regenerándose el cofactor mediante oxidación del 2-propanol y/o 2-butanol.

20 Por el término “arilo” se entienden restos de carbono aromáticos con de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo. Los restos -arilo (C_6-C_{14}) son por ejemplo fenilo, naftilo, por ejemplo 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, por ejemplo 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antrilo o fluorenilo. Los restos bifenililo, los restos naftilo y especialmente los restos fenilo son restos arilo preferidos. Por el término “halógeno” se entiende un elemento de la serie flúor, cloro, bromo o yodo. Por el término “-alquilo (C_1-C_{20})” se entiende un resto hidrocarbonado, cuya cadena de carbonos es lineal o ramificada y contiene de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonenilo o decanilo. Por el término “-alquilo C_0 ” se entiende un enlace covalente.

25 Por el término “-cicloalquilo (C_3-C_7)” se entienden restos hidrocarbonados cíclicos, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

30 El término “-heterociclo (C_5-C_{14})” representa un anillo heterocíclico de 5 miembros a 14 miembros monocíclico o bicíclico, que está parcialmente saturado o completamente saturado. Ejemplos de heteroátomos son N, O y S. Ejemplos del término “-heterociclo (C_5-C_{14})” son restos, que se derivan de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 1,2,3,5-oxatiazol-2-óxido, triazolona, oxadiazolona, isoxazolona, oxadiazolidina, triazol, que están sustituidos con F, -CN, -CF₃ o -C(O)-O-alquilo (C_1-C_4), 3-hidroxipirro-2,4-diona, 5-oxo-1,2,4-tiadiazol, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolina, cinnolina, carbolina y derivados benzocondensados, ciclopenta, ciclohexa o cicloheptacondensados de estos heterociclos. Se prefieren especialmente los restos 2 ó 3-pirrolilo, fenilpirrolilo, tales como 4 ó 5-fenil-2-pirrolilo, 2-furilo, 2-tienilo, 4-imidazolilo, metil-imidazolilo, por ejemplo 1-metil-2, -4 o -5-imidazolilo, 1,3-tiazol-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2, 3 ó 4-piridil-N-óxido, 2-pirazinilo, 2, 4 ó 5-pirimidinilo, 2, 3 ó 5-indolilo, 2-indolilo sustituido, por ejemplo 1-metil, 5-metil, 5-metoxi, 5-benciloxi, 5-cloro o 4,5-dimetil-2-indolilo, 1-bencil-2- o -3-indolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-2-indolilo, ciclohepta[b]-5-pirrolilo, 2, 3 ó 4-quinolilo, 1, 3 ó 4-isoquinolilo, 1-oxo-1,2-dihidro-3-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 2-benzofuranilo, 2-benzo-tienilo, 2-benzoxazolilo o benzotiazolilo o dihidropiridinilo, pirrolidinilo, por ejemplo 2 ó 3-(N-metilpirrolidinilo), piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrotienilo o benzodioxolanilo.

35 La invención se refiere también a procedimientos análogos para la reducción enzimática enantioselectiva del cetocompuesto 2,5-hexanodiona y del cetocompuesto acetoxiacetona.

40 La presente invención se basa en el conocimiento de que en el caso de aplicar alcohol deshidrogenasas R-específicas u óxido reductasas, éstas también pueden utilizarse a concentraciones de 2-propanol y/o 2-butanol muy por encima del 15% en volumen y especialmente por encima del 25% en volumen.

45 De esta manera se abre la posibilidad de reducir de manera enantioselectiva también sustratos poco solubles en agua, tal como por ejemplo ésteres del ácido 4-halo-3-oxobutírico a alta concentración enzimáticamente en un sistema acuoso/orgánico homogéneo. Esto supone especialmente una ventaja, cuando el alcohol quiral generado debe suministrarse en un proceso continuo directamente, sin aislamiento previo a una reacción secundaria que tiene lugar en una mezcla de reacción acuosa/orgánica monofásica.

50 Éste es el caso por ejemplo en la reducción enantioselectiva de 4-cloroacetoacetato, en el que el producto generado éster etílico del ácido S-4-cloro-3-hidroxi-butírico se alimenta a una mezcla de reacción homogénea de este tipo en un procedimiento de cianuración y puede procesarse para dar éster etílico del ácido (R)-4-ciano-3-hidroxi-butírico (documento WO 03/097581 A1).

55 Por el término “óxido reductasa R-específica” o alcohol deshidrogenasa se entienden aquéllas que reducen los compuestos de carbonilo no sustituidos, tales como por ejemplo 2-butanona, 2-octanona o acetofenona preferiblemente para dar los correspondientes R-hidroxicompuestos, tales como por ejemplo R-2-butanol, R-2-octanol o R-2-feniletanol.

ES 2 335 229 T3

La óxido reductasa R-específica utilizada según la invención es preferiblemente de origen microbiano y procede especialmente de bacterias del grupo *Lactobacillales*, especialmente del género *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus kefir* (documento US 5,200,335), *Lactobacillus brevis* (documento DE 19610984 A1) (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. diciembre de 2000; 56 Pt 12:169b-8), *Lactobacillus minor* (documento DE10119274) o *Leuconostoc carnosum*, o de levaduras, especialmente de los géneros *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*, *Debaromyces* o *Issatschenkia*, de manera especialmente preferible de *Pichia finlandica* (documento EP 1 179 595 A1).

En el procedimiento según la invención se utiliza como cofactor preferiblemente NAD(P)H. Por el término "NADPH" se entiende nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato reducido. Por el término "NADP" se entiende nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato.

Una forma de realización del procedimiento según la invención se caracteriza porque la mezcla monofásica líquida, en caso de utilizar una óxido reductasa de origen bacteriano, comprende al menos el 25% en volumen de 2-propanol y/o 2-butanol.

Una forma de realización adicional del procedimiento según la invención consiste en que la mezcla monofásica líquida comprende entre el 25 y el 90% en volumen, especialmente entre el 35 y el 70% en volumen, de 2-propanol y/o 2-butanol.

En la mezcla monofásica líquida, el compuesto de fórmula general (I) está comprendido preferiblemente entre el 5 y el 50% en peso/volumen, especialmente entre el 15 y el 50% en peso/volumen.

En el caso de aplicar una óxido reductasa de levaduras, la mezcla monofásica líquida comprende preferiblemente al menos el 15% en volumen de 2-propanol.

En el procedimiento según la invención se utiliza como compuesto de fórmula general (I) preferiblemente 4-cloroacetato de etilo, acetato de metilo, 3-oxovalerato de etilo, 4-hidroxi-2-butanona, piruvato de etilo, 2,3-dicloroacetofenona, 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etan-1-ona, acetofenona, 2-octanona, 3-octanona, 1,4-dicloro-2-butanona, cloruro de fenacilo, 4-bromoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona o 1-cloroacetona.

En el procedimiento según la invención la enzima puede utilizarse completamente purificada, parcialmente purificada o bien contenida en células. A este respecto, las células utilizadas pueden estar presentes en forma nativa, permeabilizada o lisada.

Por cada kg de compuesto de fórmula I que ha de convertirse pueden utilizarse de 10 000 a preferiblemente 10 millones de unidades (U) de óxido reductasa. A este respecto la unidad enzimática 1 U corresponde a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar 1 μ mol del compuesto de fórmula I por minuto (min.).

Al agua se le puede añadir un tampón, por ejemplo tampón fosfato de potasio, tampón Tris/HCl o tampón trietanolamina con un valor de pH de desde 5 hasta 10, preferiblemente un valor de pH de desde 6 hasta 9.

El tampón puede comprender adicionalmente además iones para la estabilización de la enzima, por ejemplo iones magnesio.

Por lo demás, en el procedimiento según la invención puede utilizarse además un estabilizador adicional de la alcohol deshidrogenasa, tal como por ejemplo glicerina, sorbitol, 1,4-DL-ditiotreitol (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

La concentración del cofactor NAD(P)H con respecto a la fase acuosa asciende a desde 0,001 mM hasta 1 mM, especialmente desde 0,01 mM hasta 0,1 mM.

La temperatura asciende por ejemplo a desde aproximadamente 10°C hasta 60°C, preferiblemente desde 20°C hasta 35°C.

A este respecto, una variante del procedimiento para aumentar el rendimiento del cetocompuesto es aquella en la que el cosustrato oxidado en el procedimiento se extrae de la mezcla de reacción o bien por etapas o bien de manera continua.

Por lo demás puede suministrarse cosustrato nuevo, enzima o cofactor a la mezcla básica de reacción por etapas o de manera continua.

El procedimiento según la invención se realiza por ejemplo en un recipiente de reacción de vidrio o metal. Para ello se traspan los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo una atmósfera de por ejemplo nitrógeno o aire. Según el sustrato y el compuesto de fórmula I utilizado el tiempo de reacción asciende a desde 1 hora hasta 96 horas, especialmente desde 2 horas hasta 24 horas.

Con los siguientes ejemplos se explican con más detalle formas de realización preferidas de la invención.

ES 2 335 229 T3

La reducción de los compuestos de fórmula 1 se realiza convenientemente de tal manera que los componentes mencionados a continuación se traspasan a un recipiente de reacción y se incuban con un buen mezclado a temperatura ambiente. Tras la finalización de la reacción puede aislarse y purificarse el producto según la solubilidad mediante extracción a partir de la disolución de reacción acuosa, mediante destilación a partir de la disolución de reacción o mediante la combinación de extracción y destilación.

En todos los ejemplos mencionados a continuación se utilizaron las enzimas en forma de extractos brutos.

Ejemplo 1

Síntesis de ácido (S)-etil-4-cloro-3-hidroxi-butírico

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 7, MgCl ₂ 2 mM)	60 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	4,8 mg		= 6,3 μmol = 0,015 mM
Cosustrato 2-propanol	200 ml	50%	
4-Cloroacetoacetato de etilo	80 ml = 96 g	20% (v/v) 24% (p/v)	0,58 mol
Enzima = R-ADH de <i>L. minor</i> = 1000 U/ml	60000 Unidades (60 ml)		
Volumen	400 ml		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	>99%		
Valor de ee	>99,9% de S		
ttn ("total turnover number, número total de ciclos) de NADP	92950		
Consumo de enzima	600000 Unidades/kg		

Ejemplo 2

Síntesis de ácido (R)-metil-3-hidroxi-butírico

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 7, MgCl ₂ 1 mM, glicerina al 10%)	300 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	10 mg		13 μmol (0,012 mM)

ES 2 335 229 T3

	Cosustrato 2-propanol	400 ml	36,6%	
5	Acetoacetato de metilo M= 116 g/mol, d= 1,077 g/cm ³	300 ml	27,5% (v/v) 29,6 (p/v)	2,7 mol
10	Enzima = R-ADH de <i>L. minor</i> = 1000 U/ml	90000 Unidades 90 ml		
15	Volumen	1090 ml		
	Tiempo de incubación	24 h		
	Rendimiento	99%		
	Valor de ee	> 99,9%		
20	ttn de NADP	207692		
	Consumo de enzima	280000 U/kg		

25 Ejemplo 3

Síntesis de D-lactato de etilo

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 7, MgCl ₂ 1 mM, glicerina al 10%)	170 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	40 mg		52 μmol (0,054 mM)
Cosustrato 2-propanol	500 ml	52%	
Piruvato de etilo M = 117 g/mol, d = 1,045)	250 ml	26% (v/v) 27,2 (p/v)	2,2 mol
Enzima = R-ADH de <i>L. minor</i> = 1000 U/ml	40000		
Volumen	960 ml		
Tiempo de incubación	48 h		
Rendimiento	99%		
Valor de ee	> 99%		
ttn de NADP	42300		
Consumo de enzima	160000 U/kg		

ES 2 335 229 T3

Ejemplo 4

Síntesis de (R)-1,3-butanodiol

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 7, MgCl ₂ 1 mM, glicerina al 10%)	0,5 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	0,1 mg		0,13 μmol (0,013 mM)
Cosustrato 2-propanol	4,5 ml	44%	
4-Hidroxi-2-butanona (M = 88,12 g/mol)	5 ml	48% (v/v)	0,057 mol
Enzima (R-ADH de <i>L. minor</i>) = 1000 U/ml	250 U (250 μl)		
Volumen	10,25 ml		
Sistema: Control del proceso*:	Eliminación por destilación monofásica de la acetona Adición de 2-propanol por etapas		
Tiempo de incubación	24 h		
Consumo total de 2-propanol	13,5 ml		
Rendimiento	90%		
Valor de ee	99% R		
ttn de NADP	438461		
Consumo de enzima	750000 U/kg		

*A partir de la mezcla básica se eliminó por destilación dos veces la acetona generada y posteriormente se añadió a la mezcla de reacción de nuevo la misma cantidad de 2-propanol y enzima, tal como al principio de la reacción. Así pudo conseguirse incluso en una mezcla básica con una concentración de sustrato del 48% un rendimiento del 90%.

ES 2 335 229 T3

Ejemplo 5

Síntesis de R-2-octanol

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 7, MgCl ₂ 1 mM, glicerina al 10%)	270 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	27 mg		35 μmol (=0,023 mM)
Cosustrato 2-propanol	900 ml	60%	
2-Octanona (128 g/mol, d= 0,8)	300 ml	20% (v/v) 16% (p/v)	1,87 M
Enzima (R-ADH de <i>L. minor</i>) = 1000 U/ml	30000 Unidades (30 ml)		
Volumen	1500		
Sistema: Control del proceso*:	Eliminación por destilación monofásica de la acetona Adición de 2-propanol por etapas		
Tiempo de incubación	24 h		
Consumo total de 2-propanol	1350 ml		
Rendimiento	97%		
Valor de ee	100% de R		
ttn de NADP	53000		
Consumo de enzima	200000 U/kg		

*A partir de la mezcla básica se eliminó por destilación una vez la acetona generada y posteriormente se añadió a la mezcla de reacción de nuevo la misma cantidad 2-propanol y enzima, tal como al principio de la reacción. Así pudo conseguirse incluso en una mezcla básica con un concentración de sustrato del 20% un rendimiento del 97%.

ES 2 335 229 T3

Ejemplo 6

Síntesis de (R,R)-2,5-hexanodiol

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 6, MgCl ₂ 1 mM, glicerina al 10%)	100 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	5 mg		6,5 μmol (0,011mM)
Cosustrato 2-propanol	325 ml	56%	
2,5-hexanodiona (114 g/mol, d= 1)	125 ml	22% (v/v) 22% (p/v)	1,09 mol
Enzima (R-ADH de <i>L. minor</i>)= 1000 U/ml	25000		
Volumen	575 ml		
Sistema: Control del proceso*:	Eliminación por destilación monofásica de la acetona Adición de 2-propanol por etapas		
Tiempo de incubación	48 h		
Consumo total de 2-propanol	650 ml		
Rendimiento	78%		
Valor de ee	100% de R,R		
ttn de NADP	168000		
Consumo de enzima	400000 U/kg		

A partir de la mezcla básica se eliminó por destilación una vez la acetona generada y posteriormente se añadió a la mezcla de reacción de nuevo la misma cantidad de 2-propanol y enzima, tal como al principio de la reacción.

ES 2 335 229 T3

Ejemplo 7

Síntesis de ácido (S)-etil-4-cloro-3-hidroxiбутírico

5

10

15

20

25

30

35

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 7, MgCl ₂ 2mM)	2 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	2 mg		= 2,6 mmol = 0,065 mM
Cosustrato 2-propanol	30 ml	65%	
4-cloroacetoacetato de etilo	8 ml = 9,6 g	17% (v/v) 20% (p/v)	58 mmol
Enzima = R-ADH de <i>Leuconostoc camosum</i> DSMZ 5576 = 1000 U/ml	6700 Unidades (6 ml)		
Volumen	46 ml		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	>99%		
Valor de ee	>99,9% de S		
ttn de NADP	22300		
Consumo de enzima	670000 Unidades/kg		

40

Ejemplo 8

Síntesis de (1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etan-1-ol

45

50

55

60

65

Componente	Cantidad	Proporción porcentual con respecto al volumen de reacción	Concentración
Tampón (TEA pH = 8,5, MgCl ₂ 2mM)	200 µl		
NAD [M = 663 g/mol]	0,05 mg		0,075 mmol (0,027 mM)
Cosustrato 2-propanol	250 µl	41,6% (v/v)	
1-[3,5-bis-(trifluoro- metil)fenil]etan-1- ona [256,15 g/mol] d=1,422	100 µl	16,6% (v/v)	

ES 2 335 229 T3

Enzima = R-ADH de <i>Pichia finlandica</i> (documento EP1179595A1)	40 Unidades (0,05 ml)		0,56 mmol
Volumen	600 µl		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	99%		
Valor de ee	99,9% de R		
ttn de NAD	aprox. 7500		
Consumo de enzima	285000 U/kg		

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos de fórmula general I



en la que R_1 representa uno de los restos

1) -alquilo (C_1-C_{20}), siendo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada,

2) -alqueno (C_2-C_{20}), siendo alqueno de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene hasta cuatro dobles enlaces,

3) -alquino (C_2-C_{20}), siendo alquino de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene hasta cuatro triples enlaces,

4) -arilo (C_6-C_{14}),

5) -alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}),

6) -heterociclo (C_5-C_{14}), que está no sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

7) -cicloalquilo (C_3-C_7);

en la que los restos mencionados anteriormente bajo 1) a 7) están no sustituidos o están mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

y R_2 representa uno de los restos

8) -alquilo (C_1-C_6), siendo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada,

9) -alqueno (C_2-C_6), siendo alqueno de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene hasta tres dobles enlaces,

10) -alquino (C_2-C_6), siendo alquino de cadena lineal o de cadena ramificada y dado el caso contiene dos triples enlaces, o

11) -alquil (C_1-C_{10})-C(O)-O-alquilo (C_1-C_6), siendo alquilo lineal o de cadena ramificada y está no sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

en la que los restos mencionados anteriormente bajo 8) a 11) están no sustituidos o están mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

caracterizado porque

una mezcla monofásica líquida que comprende

(a) al menos el 5% en peso/volumen de un compuesto de fórmula (I),

(b) al menos el 15% en volumen de 2-propanol y/o 2-butanol, y

(c) agua

se trata con una óxido reductasa R-específica en presencia de un cofactor, para formar un hidroxicompuesto quiral de fórmula general II



en la que R_1 y R_2 tienen el significado indicado anteriormente, regenerándose el cofactor mediante la oxidación del 2-propanol y/o 2-butanol.

2. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva del cetocompuesto 2,5-hexanodiona, **caracterizado** porque una mezcla monofásica líquida que comprende

(a) al menos el 5% en peso/volumen de 2,5-hexanodiona,

ES 2 335 229 T3

(b) al menos el 15% en volumen de 2-propanol y/o 2-butanol, y

(c) agua

5 se trata con una óxido reductasa R-específica en presencia de un cofactor, regenerándose el cofactor mediante la oxidación del 2-propanol y/o 2-butanol.

3. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva del cetocompuesto acetoxiacetona, **caracterizado** porque una mezcla monofásica líquida que comprende

10

(a) al menos el 5% en peso/volumen de acetoxiacetona,

(b) al menos el 15% en volumen de 2-propanol y/o 2-butanol, y

15

(c) agua

se trata con una óxido reductasa R-específica en presencia de un cofactor, regenerándose el cofactor mediante la oxidación del 2-propanol y/o 2-butanol.

20

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la óxido reductasa R-específica es de origen microbiano y procede especialmente de bacterias del grupo *Lactobacillales*, especialmente del género *Lactobacillus*, o de levaduras, especialmente de los géneros *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*, *Debaromyces* o *Issatschenkia*.

25

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque como cofactor se utiliza NAD(P) H.

30

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la mezcla monofásica líquida, en caso de usar una óxido reductasa de origen bacteriano, comprende al menos el 25% en volumen de 2-propanol y/o 2-butanol.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la mezcla monofásica líquida comprende entre el 25 y el 90% en volumen, especialmente entre el 35 y el 70% en volumen, de 2-propanol y/o 2-butanol.

35

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la mezcla monofásica líquida comprende el cetocompuesto entre el 5 y el 50% en peso/volumen, especialmente entre el 15 y el 50% en peso/volumen.

40

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 4 a 8, **caracterizado** porque como compuesto de fórmula general (I) se utiliza 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, 3-oxovalerato de etilo, 4-hidroxi-2-butanona, piruvato de etilo, 2,3-dicloroacetofenona, acetofenona, 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etan-1-ona, 2-octanona, 3-octanona, 1,4-dicloro-2-butanona, cloruro de fenacilo, 4-bromoacetoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona o 1-cloroacetona.

45

50

55

60

65