



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 279**

51 Int. Cl.:
C12P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06763918 .7**

96 Fecha de presentación : **28.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1904640**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Reducción asimétrica de 1,1,1-trifluoroacetona.**

30 Prioridad: **08.07.2005 EP 05106261**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2009

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Doswald, Stephan;**
Hanlon, Steven Paul y
Kupfer, Ernst

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 328 279 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

Reducción asimétrica de 1,1,1-trifluoroacetona.

5 La presente invención se refiere a la preparación de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol enantioméricamente puro (> 99% de exceso enantiomérico) con un biocatalizador por una reducción asimétrica de 1,1,1-trifluoroacetona.

10 El (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol enantioméricamente puro es un bloque de formación importante para la preparación de ingredientes farmacéuticos activos isomericamente puros (APIs), utilizado para el tratamiento de trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos. Para la preparación de APIs es absolutamente necesario utilizar bloques de formación isomericamente puros y/o procedimientos altamente estereoselectivos, debido a que los componentes secundarios en APIs pueden tener efectos nocivos en el tratamiento de enfermedades. Por lo tanto, se requiere una pureza elevada para todos los APIs.

15 El objeto de la presente invención es la preparación de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol enantioméricamente puro con un exceso enantiomérico (ee) de > 99%, que se puede utilizar como un bloque de formación clave para la preparación de APIs enantioméricamente puros como, por ejemplo, de acuerdo a lo descrito en la Patente WO 2005/014563. Puesto que ni la pureza enantiomérica del bloque de formación (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol ni sus intermedios subsecuentes en la síntesis hacia los APIs respectivos pueden ser enriquecidos este es primordial para utilizar en la síntesis de (S)-
20 1,1,1-trifluoro-2-propanol de > 99% de ee.

J. W. C. Crawford (1967), J. Chem. Soc. (C) 2332-2333, describe un método para producir (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol, en donde

25 ácido (±)-1-(trifluorometiletoxi)propionico (el aducto del alcohol y ácido acrílico) fue separado en sus isómeros ópticos a través de su sal de quinina, y (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol puro fue obtenido de ácido alcoxi enantiomérico puro por hidrólisis alcalina y destilación. Aunque este método produce (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol de alta pureza enantiomérica (rotación óptica: -5.65°), el método no es apropiado para la producción a grande escala.

30 T. C. Rosen *et al.* (2004), *Chimica Oggi Suppl.* 43-45, prepara ambos (R)- y (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol por reducción asimétrica de 1,1,1-trifluoroacetona utilizando alcohol deshidrogenasa (ADHs) ya sea en sus huéspedes naturales o como enzimas recombinantes expresadas en *E. coli*. En reposo las células completas o extractos libres de células crudos pueden ser utilizados y en el último caso la adición de un sistema de regeneración de cofactor es necesario. El (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol resultante está disponible para comprarse en Jülich Fine Chemicals, pero
35 el material ofrecido es de escasa pureza enantiomérica (>92.5% de ee) para nuestras necesidades.

M. Buccierelli *et al.* (1983), *Synthesis* 11, 897-899, describe la preparación de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol por reducción de 1,1,1-trifluoroacetona usando (en reposo) levadura de Baker en escala de laboratorio. Aunque la reacción actúa rápidamente (4 horas), se requiere un exceso de 300 veces de levadura con respecto al sustrato, la concentración
40 del sustrato es solamente 2.5 g/kg de suspensión de levadura, y (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol se obtiene solamente con aproximadamente 80% de ee (de acuerdo a lo calculado de la rotación óptica de -4.5° para el alcohol aislado, comparado con -5.6° para el alcohol puro), un valor que está excesivamente bajo para nuestras necesidades. Además, el protocolo de aislamiento, basado en la extracción repetida de solvente en combinación con la destilación, no es aplicable económicamente en gran escala.

45 Hay varios métodos utilizados en la literatura para optimizar la estereoselectividad de reducciones microbianas, por ejemplo tratamiento de acetona de células microbianas o realizar la biotransformación en solventes orgánicos. Ambos métodos tienen las desventajas que utilizan solventes que hacen un proceso más costoso y, más importante, el solvente utilizado además complica el procedimiento ya exigente para el aislamiento de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol, el cual posee un punto de fusión de 76-77°C.
50

Otro método para aumentar la estereoselectividad es utilizar inhibidores para bloquear las enzimas que producen el isómero indeseado. A. C. Dahl *et al.* (1999), *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 551-559, reportó la reducción de etil-3-oxopentanoato con levadura de Baker no sometida a un tratamiento térmico y alcohol alílico a etil-3(R)-hidroxipentanoato (100% de rendimiento y 92-93% de ee). Cuando la levadura de Baker tratada térmicamente (48°C por 60 minutos) fue utilizada en combinación con alcohol alílico el producto fue obtenido con el rendimiento de 80-95% y el ee fue aumentado hasta 98%. Sin embargo, para una reacción exitosa una concentración de sustrato de aproximadamente 1 g/L fue utilizada y levadura 250 veces en relación con el sustrato, respectivamente 4 veces el inhibidor en relación con el sustrato fue requerido.
55

60 Otro método para influenciar la estereoselectividad de una reducción microbiana es realizar un tratamiento térmico de células microbianas, para inactivar las enzimas que producen el estereoisómero no deseado. Y. Yasohara *et al.* (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 847-851, investigaron la reducción de 4-cloro-3-oxobutirato de etilo (COBE) a 4-cloro-(S)-3-hidroxibutirato (CHBE) con varias levaduras. La acetona trató células de *Candida magnolia* convertida a COBE con rendimiento de 75% molar a (S)-CHBE con 91.0% de ee. Cuando las células de *C. magnolia* fueron tratadas térmicamente (60°C), (S)-CHBE fue obtenido con el 75% de rendimiento con > 98% de ee. Por otra parte, cuando células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas con acetona fueron utilizadas (sin tratamiento térmico), se obtuvo (S)-CHBE con rendimiento molar de 53% y solamente con 14.8% de ee. Después de tratamiento térmico de
65

células de *S. cerevisiae* a 50°C, se obtuvo (S)-CHBE con solamente 10% de rendimiento con 53.8% de ee. (S)-CHBE fue obtenido con > 98% de ee después de tratamiento térmico a 60°C (rendimiento de 8%). En una escala preparatoria, utilizando *C. magnoliae*, 90 g/L de COBE fueron convertidos cuantitativamente a (S)-CHBE con 96.6% de ee en el plazo de 60 horas, respectivamente con el rendimiento de 97% y con > 99% de ee, utilizando células tratadas térmicamente. La reacción fue realizada en un sistema de dos fases con n-butil acetato y requirió un sistema de regeneración de coenzima (glucosa, NAD (P) y glucosa deshidrogenasa). El requisito para un sistema de regeneración de cofactor basado en glucosa deshidrogenasa es debido a la inactivación de enzimas endógenas por el tratamiento de acetona.

Z.H. Yang *et al* (2004), Ind. Eng. Chem. Res. 43, 4871-4875, describió también la reducción asimétrica de COBE a (S)-CHBE catalizado por levadura. Con el tratamiento térmico de la levadura (50°C) el ee de (S)-CHBE aumentó desde 84% hasta 97%, con un aumento en el tiempo de pretratamiento desde 30 hasta 120 min. Por otra parte la conversión de COBE disminuyó desde 96% hasta 82%. La glucosa fue utilizada para regenerar NAD(P) hasta NAD (P)H. La reacción fue realizada con levadura procedente de levadura de Baker seca. El procedimiento descrito no es útil ni económico para utilizar en gran escala.

K. Nakamura *et al.* (1996), Tetraedron: Asymmetry 7, 409-412, describió la reducción de levadura de α -dicetonas a los hidroxiketocompuestos correspondientes, en donde el tratamiento térmico influenció la regioselectividad de la reacción. Aunque, por ejemplo, la reducción de 1-fenil-1,2-propanodiona con levadura tratada térmicamente produjo 1-fenil-2-hidroxi-1-propanona con el rendimiento de 80% y > 98% de ee, la reacción requirió una cantidad relativamente grande de levadura (30 veces en relación al sustrato).

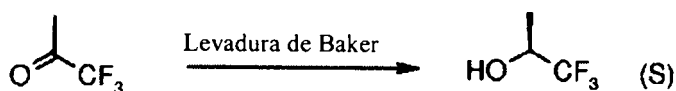
El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento eficiente para producir (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol de alta pureza enantiomérica (>99% de ee).

Se encontró que la estereoselectividad de levadura de Baker comercial excepcionalmente barata puede ser influenciada por un tratamiento térmico definido tal como 1,1,1-trifluoroacetona se puede reducir a (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol de alto ee casi cuantitativamente.

No se requiere ningún inhibidor enzimático y ningún sistema de regeneración de coenzima para lograr la alta pureza enantiomérica deseada de > 99%. Afortunadamente, la inactivación del biocatalizador por este tratamiento térmico es suficientemente limitado de manera que aún una concentración de sustrato técnicamente relevante puede ser empleada y la cantidad de biomasa (la cual tiene que ser utilizada para la compensación de pérdidas de la actividad) sigue siendo aceptable para un proceso de elaboración eficiente. La producción de etanol durante la biotransformación puede ser mantenida en un nivel que permite un proceso de elaboración eficiente. Además, un proceso de recuperación de producto técnicamente atractivo fue desarrollado, basado en destilación solamente.

La invención puede ser descrita más detalladamente como sigue:

Esquema de reacción 1



exceso enantiomérico: > 99%

La invención se refiere a un proceso biocatalítico graduable para la preparación de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol por reducción microbiana asimétrica de 1,1,1-trifluoroacetona con levadura de Baker con una pureza enantiomérica de > 99%, que comprende los pasos

a) calentar una suspensión de levadura de Baker en tampón de fosfato de potasio 0.1-0.4M a 50-52°C durante un periodo de 60 minutos,

b) mantener esta suspensión a 50-52°C en un período adicional de 90 minutos,

c) diluir la suspensión calentada con tampón a una concentración de levadura de 20-30% peso/volumen y enfriar a 10°C durante 120 minutos,

d) mantener el pH constante de 7.4 a 7.5 por adición automática de la solución de KOH 4M en el proceso completo,

e) agregar 1,1,1-trifluoroacetona a una concentración de 1-5% (peso/volumen) para realizar la biotransformación a una temperatura inferior al punto de ebullición de 1,1,1-trifluoroacetona,

f) reducir 1,1,1-trifluoroacetona a (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol a una temperatura de 20°C en el plazo de 5 a 8 días, y

g) aislar el (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol mediante una secuencia de pasos de destilación.

ES 2 328 279 T3

Como se aquí utiliza, “levadura de Baker” es una levadura de Baker comercial estándar barata, obtenible en cantidades a granel, por ejemplo de Klipfel AG, Rheinfelden (Suiza).

Las condiciones preferidas son como sigue:

i) la biotransformación se realiza a temperatura ambiente en un período de 5-8 días,

ii) la solución tampón es solución tampón de fosfato 0.1M con pH de 7-8,

iii) la concentración de sustrato es 2-4% peso/volumen,

iv) la concentración de sustrato es 3% peso/volumen,

v) el último paso de la destilación es una rectificación,

vi) (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol se utiliza como bloque de formación para APIs en trastornos psíquicos,

vii) (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol se utiliza como bloque de formación para APIs de acuerdo a lo descrito en la Patente WO 2005/014563,

viii) Los APIs de acuerdo a lo descrito en la Patente WO 2005/014563 pueden ser preparados con una pureza isomérica de > 99% ee.

El obstáculo de una reducción asimétrica altamente estereoselectiva de 1,1,1-trifluoroacetona por levadura de Baker es como también en parte se muestra por las referencias citadas el efecto adverso del tratamiento térmico, por una parte aumenta estereoselectividad (obviamente inactivando predominantemente las enzimas reductoras menos selectivas) y por otra parte disminución de actividad (obviamente inactivando también las enzimas selectivas). Este obstáculo puede ser esperado por ser más pronunciado en concentraciones de sustrato más altas, técnicamente más relevante (pero fisiológicamente menos favorable).

Asombrosamente, ahora se ha encontrado que existe un puente extremadamente estrecho de condiciones para un tratamiento térmico de levadura de Baker (50-52°C durante 90-240 minutos) para reducir significativamente la actividad de las enzimas indeseadas sin afectar demasiado la actividad y la estabilidad de las enzimas selectivas.

La levadura de Baker preconicionada entonces se puede utilizar para preparar (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol por reducción de 1,1,1-trifluoroacetona sin utilizar un inhibidor enzimático adicional - con > 99% de ee, en una concentración de sustrato aún técnicamente relevante y una concentración de biomasa aceptable de levadura de 30% peso/volumen (exceso de 10 veces de levadura con respecto al sustrato) que permite un procedimiento de elaboración con rendimiento excelente.

La reducción casi cuantitativa del sustrato sin requerir un sistema de regeneración de coenzima es importante también para el proceso debido al precio elevado del sustrato. Se ha encontrado que hay un intervalo de temperaturas muy estrecho para el tratamiento térmico entre la selectividad insuficiente y la inactivación del catalizador.

Además, la levadura de Baker no sólo está disponible en el comercio, y por lo tanto no se requiere ningún equipo de fermentación para preparar el biocatalizador para realizar el proceso, sino que es también excepcionalmente barato. Esto contribuye además a la economía del proceso.

El proceso también se puede realizar utilizando levadura de Baker de otros fabricantes, por ejemplo de DSM (Dordrecht, Países Bajos), Proofex (Dublín, Irlanda), S.I. de Leuvre Fala (Estrasburgo, Francia), Suomen Hiiva Oy (Lahti, Finlandia) o Hefe Fabrik Giegold (Schwarzenbach, Alemania). En todos los casos el exceso enantiomérico del TFIP producido en biotransformaciones que siguen tratamiento térmico a 50°C es $\geq 99\%$ (ver la Tabla que sigue). Que el tratamiento térmico tuvo un efecto ampliamente similar sobre la selectividad de todas las levaduras probadas indica que cualquier levadura de Baker disponible en el comercio puede ser utilizada en el proceso descrito.

ES 2 328 279 T3

| Proveedor de levadura | Tratamiento térmico | EtOH (g/L) | Rendimiento TFIP (%) | R-TFIP (%) | S-TFIP (%) |
|-----------------------|---------------------|------------|----------------------|------------|------------|
| Klipfel | No | 1.1 | 94.8 | 2.1 | 97.9 |
| Klipfel | Si | 0.7 | 73.5 | 0.2 | 99.8 |
| DSM | No | 5.0 | 88.3 | 3.1 | 96.1 |
| DSM | Si | 6.3 | 67.8 | 0.4 | 99.6 |
| Proofex | No | 0.2 | 31.1 | 1.5 | 98.5 |
| Proofex | Si | 0.0 | 38.8 | 0.4 | 99.6 |
| Fala | No | 5.3 | 96.9 | 2.2 | 98.8 |
| Fala | Si | 3.1 | 80.2 | 0.2 | 99.8 |
| Suonenhiiva | No | 3.9 | 91.7 | 1.9 | 98.1 |
| Suonenhiiva | Si | 4.2 | 64.7 | 0.5 | 99.5 |
| Giegold | No | 7.5 | 70.0 | 2.4 | 97.6 |
| Giegold | Si | 4.7 | 42.0 | 0.6 | 99.4 |

Los resultados se han logrado como sigue:

50 g de cada levadura fueron suspendidos a un volumen final de 100 ml en solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M de pH 7.4 y transferidos a botellas de vidrio de 250 ml. Las levaduras suspendidas fueron sometidas a tratamiento térmico a 50°C por 2 horas en un baño de agua caliente. Después de enfriarse en hielo las levaduras fueron diluidas hasta 30% de peso/volumen de solución amortiguadora. Alícuotas de 2.5 ml fueron luego transferidas a botellas de suero de 10 ml y 86 µl de una solución de 940 g/L de TFAC en agua agregada para dar una concentración final de 3% peso/volumen. Después de cerrar con sellos de caucho las botellas fueron incubadas durante 6 días con rotación a 20°C. Las muestras periódicamente fueron separadas y analizadas por Cromatografía de Gas y Cromatografía de Gas quiral para la cuantificación de TFAC (1,1,1-trifluoro-acetona), EtOH (etanol) y TFIP (1,1,1-trifluoro-2-propanol) y determinación de exceso enantiomérico del producto.

Además, y no menos importante, fue encontrado un procedimiento de elaboración eficiente simple e inesperado para recuperar el producto con alta pureza y rendimiento fuera de este biocaldo de alta densidad. Este proceso se basa solamente en destilación. No se utiliza ningún solvente de extracción para recuperar el producto.

El proceso completo para la preparación de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol (Esquema 1) puede ser subdividido formalmente en tres pasos:

1. Pre-tratamiento de levadura de Baker

La levadura (2-4 kg) se suspende en solución amortiguadora de fosfato de potasio (pH = 7.4) y la suspensión traída al volumen final deseado de 6 L. La suspensión se calienta a 50°C en un período de 60 minutos y se mantiene a esta temperatura por otros 90 minutos. Después de 90 minutos se suspendió el calentamiento y una porción adicional de solución amortiguadora de fosfato de potasio frío se agregó para ajustar la concentración de levadura hasta 30% de peso/volumen. La suspensión se enfrió a 5-20°C durante 90 Min.

2. Biotransformación

Se agregó 1,1,1-Trifluoroacetona (0.15-0.3 kg) a la suspensión enfriada de levadura obtenida en el paso 1 y la temperatura se lleva a 20°C. Para mantener la concentración de etanol en el caldo de reacción baja, el pH es mantenido de 7.4 a 7.5 con la adición controlada de la solución de KOH 4M. Debido a los puntos de ebullición muy similares de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol (punto de ebullición 76-77°C) y de etanol (punto de ebullición 78°C), una concentración baja de etanol en la mezcla de reacción es esencial para aislar (S)-1, 1,1-trifluoro-2-propanol libre de etanol con alto rendimiento. Este aspecto es una parte esencial de este procedimiento. Opcionalmente, el sustrato puede ser agregado en un proceso de tipo partidas de alimentación.

La concentración de sustrato utilizada en el presente proceso es significativamente más alta que la descrita en el arte previo. Esta productividad volumétrica más alta resulta en considerables ahorros de costo debido a volúmenes más pequeños requeridos para la reacción y el aislamiento del producto. Se ha encontrado una conversión prácticamente completa de sustrato si el tiempo de reacción es 5-8 días.

3. Aislamiento y purificación de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol

Se aisló (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol del biocaldo obtenido en el paso 2. En la primera destilación por partidas el volumen del producto es reducido por un factor de 10 y se obtiene una solución TFIP acuosa de aproximadamente 25% w/w. Inesperadamente, a pesar del alto contenido de biomasa (empleado para compensar la pérdida de actividad enzimática) del biocaldo, el producto puede ser recuperado con rendimiento prácticamente cuantitativo. En la segunda destilación por partidas en cloruro de sodio el contenido de agua del producto se reduce adicionalmente para producir un producto de aproximadamente 90% m/m. Alternativamente, la segunda destilación por partidas se puede realizar sin cloruro de sodio, produciendo un producto de aproximadamente 80% w/w.

En la tercera destilación, la rectificación en una columna empacutada, se separan los productos secundarios indeseados tales como rastros de 1,1,1-trifluoroacetona no reaccionada y etanol. Se obtuvo (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol purificado finalmente como producto al 95% w/w, con agua al 5% y < 0.2% de impurezas orgánicas. El contenido de etanol es crítico (ya que puede reaccionar en la etapa de reacción subsiguiente y también y deteriorar la pureza del API) y debe ser < 0.5% (w/w) que es más bien un desafío para la biotransformación y el proceso de elaboración. Opcionalmente, (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol anhidro puede ser preparado por la introducción un paso de secado con tamiz molecular antes o después del último paso de destilación, o utilizando la destilación extractiva o pervaporación.

También se ha mostrado que el aumento de la concentración de levadura hasta 60% de peso/volumen conduce a una reducción significativa en el tiempo de reacción (factor 2) necesario para alcanzar el rendimiento de 95%, que potencialmente conduce a ahorros de costo en escala de producción. Los efectos de doblar la concentración de levadura a partir de 30% peso/volumen hasta 60% de peso/volumen en biotransformaciones en la escala de 10 L se muestran en la tabla que sigue:

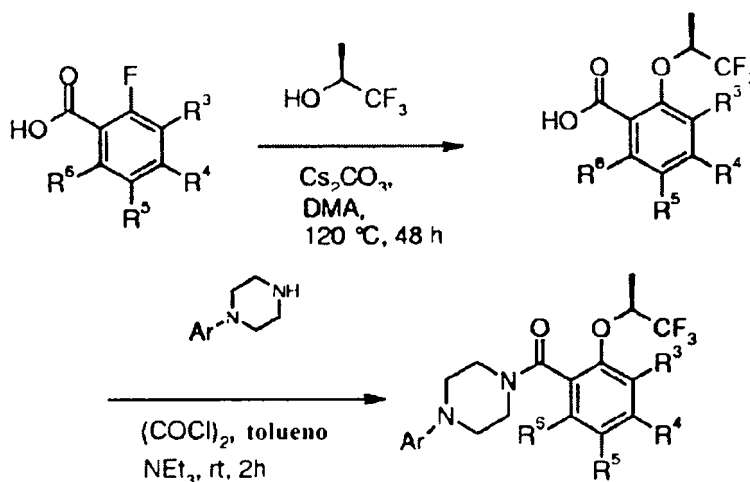
| Experimento | Concentración de levadura (w/v) | Tiempo de reacción (h) | Rendimiento de Biotransformación (%) |
|-------------|---------------------------------------|------------------------------|--|
| A | 30% | 66 | 78 |
| | | 138 | 94 |
| B | 30% | 66 | 84 |
| | | 138 | 95 |
| C | 60% | 66 | 96 |
| | | 138 | - |
| D | 60% | 66 | 98 |
| | | 138 | - |

De acuerdo a lo mencionado antes, el (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol obtenido puede ser utilizado como bloque de formación para la preparación de compuestos farmacéuticamente activos, que tienen una fracción de éter 1,1,1-trifluoropropano-2-il S-configurada. Como ejemplo, el esquema 2 muestra la preparación de compuestos farmacéuticamente activos los cuáles son inhibidores del transportador de glicina usando un bloque de formación de esta índole. Estos compuestos se describen en la Patente WO 2005/014563.

Los compuestos preparados en el esquema 2 contienen una fracción de éter 1,1,1-trifluoropropano-2-il (S)-configurada que se introduce en la molécula por medio del bloque de formación (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol en el penúltimo paso de la síntesis en una sección de una síntesis convergente (ver esquema de reacción 2).

ES 2 328 279 T3

Esquema de reacción 2



Ningún procedimiento de cristalización se ha encontrado hasta ahora para enriquecer enantioméricamente los intermedios a través del API. Por lo tanto, es imperativo utilizar (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol de una pureza enantiomérica > 99% para la síntesis de los APIs.

Ejemplos

Escala de laboratorio

Ejemplo 1

Pre-tratamiento de levadura de Baker

3.0 Kg de levadura de Baker (Blockhefe of Klipfel AG, Rheinfelden, Suiza; No. del producto 101010) fueron dispersados en tampón de fosfato de potasio 0.1M con pH de 7.4 y el volumen preparado hasta 6 L (50% peso/volumen) con el mismo tampón. La levadura suspendida fue transferida luego a un reactor de vidrio de 15 L a temperatura controlada. Para la mezcla se utilizó un agitador montado en la parte superior (200 rpm). Luego se calentó la suspensión de levadura desde temperatura ambiente hasta 50°C en un período de 60 minutos y la temperatura mantenida en este valor por 90 minutos más. En este punto de calentamiento se detuvo. 4 L más de solución amortiguadora fría (4°C) fueron agregados luego para producir el volumen total hasta 10 L (30% peso/volumen de levadura). El caldo fue enfriado a 10°C durante aproximadamente 90 minutos. Un valor de pH de 7.4 hasta 7.5 fue mantenido por adición automática de solución de KOH 4M usando un pH constante.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 328 279 T3

| Tratamiento térmico | | |
|---------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Tiempo (min) | Temperatura (°C) | Solución de KOH 4M consumida (g/L) |
| 0 | 24.3 | 2 |
| 20 | 35.0 | 2.6 |
| 45 | 47.8 | 4 |
| 60 | 49.2 | 5.8 |
| 90 | 49.4 | 10.4 |
| 150 | 49.4 | 16.8 |
| 160 | 43.3 | n.d. |
| 170 | 28.9 | 19.6 |
| 195 | 24.3 | 21.2 |
| 215 | 18.3 | 24.2 |
| 245 | 11.2 | 26.2 |

Ejemplo 2

Biotransformación

304 g de 1,1,1-Trifluoroacetona fueron agregados al caldo enfriado (10 L) y la temperatura fue mantenida a 20°C para la duración de la reacción que fue 5 días en este caso. El caldo de reacción en el recipiente fue continuamente recubierto con nitrógeno (razones de seguridad). El pH fue mantenido a 7.4 hasta 7.5 por la adición automática de la solución de KOH 4M a partir de pH constante. Periódicamente, las muestras fueron extraídas y analizadas por Cromatografía de Gas y Cromatografía de Gas quiral para cuantificación de TFAC (1,1,1-trifluoroacetona), EtOH (etanol) y de TFIP (1,1,1-trifluoro-2-propanol) y la determinación del exceso enantiomérico del producto.

| Biotransformación | | | | | |
|------------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Tiempo de reacción (h) | TFAC (g/L) | EtOH (g/L) | TFIP (g/L) | R-TFIP (%) | S-TFIP (%) |
| 1 | 23.0 | 2.3 | 0.7 | | |
| 2.5 | 19.5 | 2.8 | 2.8 | | |
| 71 | 4.6 | 2.4 | 21.5 | 0.4 | 99.6 |
| 90 | 2.5 | 2.5 | 24.1 | | |
| 96.5 | 3.1 | 2.2 | 24.0 | | |
| 117 | 2.7 | 2.3 | 24.7 | | |
| 144 | 2.4 | 2.0 | 24.0 | | |

ES 2 328 279 T3

Ejemplo 3

Aislamiento de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol a partir del biocaldo y su enriquecimiento

- 5 10.9 Kg de biocaldo fueron transferidos a un rotavapor Büchi R152 con un matraz de fondo redondo de 20 L, equipado con una trampa fría (hielo seco). La destilación fue realizada a una temperatura del baño de 60°C en vacío de 140 mbar y a una temperatura del condensador de 15°C. La temperatura de destilación observada fue 55°C. La fracción 1 (ver abajo) fue combinada con el producto obtenido en la trampa fría (solución bifásica). La composición de los productos fue analizada por Cromatografía de Gas.

10

15

20

25

30

| 1ª destilación | | | | |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Descripción del producto | peso (g) | TFAC (g) | EtOH (g) | TFIP (g) |
| Biocaldo | 10919.0 | 26.2 | 21.8 | 262.2 |
| Fracción 1 & producto de trampa fría | 1001.9 | 20.7 | 4.7 | 258.8 |
| Fracción 2 | 548.4 | 4.3 | 3.4 | 1.0 |
| Colector de destilación | 9539.0 | 1.2 | 13.8 | 2.5 |

35

Al producto de la primera destilación (fracción 1 y producto de la trampa fría) fueron agregados 300 g de cloruro de sodio y la mezcla fue agitada por una hora. Una mezcla de TFIP, fase acuosa y cloruro de sodio fue obtenida. La mezcla completa fue transferida a un rotavapor de Büchi R124 con un matraz de fondo redondo de 2 L. La destilación fue realizada a una temperatura del baño de 90-98°C a presión ambiente y a una temperatura del condensador de 15°C. Una primera fracción de TFIP fue obtenida a 82-85°C, una segunda fracción a 85-98°C.

40

45

50

55

60

| 2ª destilación | | | | | |
|------------------------------------|-------|----------|----------|----------|----------|
| Descripción del producto | | peso (g) | TFAC (g) | EtOH (g) | TFIP (g) |
| Producto de la 1ª destilación/NaCl | | 1301.9 | 20.7 | 4.7 | 258.8 |
| Fracción 1 | 82-85 | 287.1 | 12.2 | 7.8 | 254.6 |
| Fracción 2 | 85-98 | 9.2 | 0.3 | 0.5 | 7.5 |
| Colector de destilación | | 1003.1 | 0.1 | 6.9 | 3.8 |

El producto obtenido por combinación de las fracciones 1 y 2 fue utilizado para la destilación final.

65

ES 2 328 279 T3

Ejemplo 4

Purificación final de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol

- 5 625 g de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol enriquecido obtenido después de la segunda destilación a partir de dos reacciones de biotransformación en la escala de 10L, fue utilizado para la destilación fraccionada final. La destilación fue realizada utilizando un matraz de fondo redondo de 1 L conectado con una columna de destilación de 5 x 150 cm (Sulzer packing BX). La columna fue equipada con un divisor de reflujo en la parte superior. La destilación fue realizada a una temperatura del baño de 150°C a presión ambiente y a una temperatura del condensador de 5°C.
- 10 La proporción de reflujo seleccionado (1:20 hasta 1:99) fue dependiente en la calidad del producto obtenido (por monitoreo en Cromatografía de gas). El tiempo para la extracción del destilado fue 1 segundo.

| 3 ^a destilación | | | | | | |
|----------------------------|------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| Descripción del producto | RLV | Bp (°C) | Peso (g) | TFAC (g) | EtOH (g) | TFIP (g) |
| Material de partida | - | | 624.6 | 9.11 | 37.58 | 546.6 |
| Fracción 1 | 1:20 | 59.0-76.4 | 86.0 | 8.69 | 0.08 | 76.0 |
| Fracción 2 | 1:20 | 76.4-76.7 | 49.5 | 0.61 | 0.00 | 49.1 |
| Fracción 3 | 1:20 | 76.7-76.8 | 49.1 | 0.28 | 0.00 | 50.3 |
| Fracción 4 | 1:20 | 76.8-76.9 | 51.4 | 0.15 | 0.00 | 54.4 |
| Fracción 5 | 1:20 | 76.9 | 47.7 | 0.08 | 0.00 | 50.9 |
| Fracción 6 | 1:20 | 76.9 | 46.9 | 0.05 | 0.00 | 48.99 |
| Fracción 7 | 1:40 | 76.9 | 26.4 | 0.02 | 0.02 | 27.56 |
| Fracción 8 | 1:40 | 76.9-77.0 | 28.3 | 0.04 | 0.04 | 28.62 |
| Fracción 9 | 1:40 | 77.0-77.4 | 33.7 | 0.03 | 0.18 | 35.01 |
| Fracción 10 | 1:40 | 77.4-78.2 | 22.7 | 0.02 | 0.49 | 23.51 |
| Fracción 11 | 1:40 | 78.2-78.3 | 3.26 | 0.01 | 0.14 | 2.88 |
| Fracción 12 | 1:99 | 78.3-79.1 | 31.8 | 0.04 | 2.42 | 27.36 |
| Fracción 13 | 1:99 | 79.1-79.3 | 23.1 | 0.02 | 3.27 | 16.81 |
| Colector de destilación | - | | 108.4 | 0.35 | 35.87 | 64.39 |

El producto final obtenido combinando las fracciones 2 a 8 (299 g) mostró los siguientes datos analíticos:

- 60 Identidad por NMR (CDCl₃) y HPLC/MS: de acuerdo;
- composición (Cromatografía de Gas): 94.8% w/w de TFIP, 0.4% w/w de TFAC, 0.02% w/w de etanol;
- contenido de agua (Karl-Fisher): 4.8% w/w;
- 65 exceso enantiomérico (Cromatografía de Gas quiral): 99.3%.

Preparación a gran escala

Ejemplo 5

5 *Pre-tratamiento de levadura de Baker*a) *Tratamiento térmico de levadura de Baker*

Un recipiente de reacción de acero inoxidable de 800 L fue llenado con 240 L de tampón de fosfato 0.1 M con pH de 7.5 enfriada a 10°C. El tampón fue preparado disolviendo 10.88 kg de dihidrogen fosfato potásico (No. de producto 60220; Fluka/Suiza) y 4.08 kg de hidróxido de potasio (No. de producto 60370; Fluka/Suiza) en 804 L de agua desionizada. 240 kg de levadura de Baker (No. de producto 104020, Sackhefe"; Klipfel AG, Rheinfelden/Suiza) fueron agregados con agitación. La mezcla fue agitada adicionalmente a 10°C for 60 minutos para homogenizar la suspensión de levadura. Un sensor de temperatura sumergido en la suspensión fue instalado y el reactor fue inertizado. La suspensión de levadura fue calentada a 50.3°C (+/- 0.5°C) durante 83 minutos y mantenida 50.3°C (+/- 0.5°C) por 90 Min. Luego se adicionaron 320 L de tampón de fosfato 0.1 M de pH 7.5 de 10°C y la mezcla fue enfriada a 10°C durante 67 Min. Durante el tratamiento térmico el valor de pH de la suspensión fue mantenido en pH 7.5 por la adición controlada (pH constante) de una solución de hidróxido de potasio al 50% (12.0 kg). La suspensión de levadura preparada fue almacenada temporalmente a 10° C en el recipiente de reacción por 25 h, manteniendo el control de pH 7.5 (5.8 kg de solución de hidróxido de potasio al 50% consumida).

b) *Prueba de uso de levadura de Baker tratada térmicamente*

Una prueba de uso fue realizada para verificar la actividad/estereoselectividad deseada de la adición anterior preparada de levadura de 1,1,1-trifluoroacetona cara. 2 L de suspensión de levadura tratada térmicamente fueron colocados en un reactor de vidrio de laboratorio de 2 L. 60 g de 1,1,1-trifluoroacetona fueron agregados con agitación a la suspensión enfriada (10°C). La mezcla de reacción fue calentada posteriormente a 21°C durante 60 Min. Durante la biotransformación el valor de pH de la mezcla de reacción fue mantenida a un pH de 7.5 por la adición controlada (pH constante) de una solución de hidróxido de potasio al 25% (16 g agregados en el plazo de 20 horas). (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol fue obtenido con rendimiento de 32% y 99.2% de ee después del tiempo de reacción de 20 horas (criterios de la prueba: >25% de rendimiento y > 98.9% de ee después del tiempo de reacción de 15-30 horas).

35 Ejemplo 6

Biotransformación

24.7 kg de 1,1,1-trifluoroacetona enfriada con hielo fueron transferidos por medio de una pipeta durante 55 minutos a la suspensión de levadura enfriada (10°C) con agitación. Después de agitar por 20 minutos adicionales la temperatura de la mezcla de reacción fue aumentada a 20°C durante 55 minutos. Durante la biotransformación el valor de pH de la mezcla de reacción fue mantenida a un pH de 7.5 por la adición controlada (pH constante) de una solución de hidróxido de potasio al 50% (16.8 kilogramos consumidos durante 159 horas). (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol fue obtenido con rendimiento de 96% y 99.4% de ee después de tiempo de reacción de 159 horas. 860 kg de mezcla de reacción fueron obtenidos. La mezcla de reacción entonces fue almacenada por 1 día a 20°C y 3 días a 6°C antes de iniciar la recuperación del producto destilativo.

Ejemplo 7

50 *Aislamiento de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol del biocaldo y su enriquecimiento*a) *Primera destilación*

La destilación fue realizada fuera del recipiente de reacción el cual fue equipado con un condensador. La destilación se realizó a la temperatura de camisa de 60°C, presión de 140 mbar y temperatura del condensador de 6-8°C. Para prevenir espumación excesiva 0.5 kg antiespumante Basildon (producto no. BC 86/013; Basildon Chemical Company Ltd/Inglaterra) fue agregado. La composición del producto fue analizada por Cromatografía de Gas. La destilación produjo 101 kg del producto del paso 1, producto incl. en la trampa fría de hielo seco. La composición del producto fue 19.8 m/m-% de 1,1,1-trifluoro-2-propanol, 0.2% de 1,1,1-trifluoroacetona, 2.5% de etanol y 77.5% de agua.

b) *Segunda destilación*

La destilación del producto del paso 1 fue realizada en tres partidas cada una aproximadamente de 30 L en un rotavapor de Büchi R187 con un matraz de destilación de 50 L. A una temperatura de baño de 90°C y una temperatura del condensador de 12-15°C se tomó una primera fracción a presión normal hasta que la temperatura de cabeza cayó hasta < 60°C. Una segunda fracción fue tomada a 700 mbar y una tercera fracción a 500 mbar. La calidad de las

fracciones obtenidas fue analizada con Comatografía de Gas y la reunión de fracciones apropiadas fue hecha de acuerdo a un criterio de pureza predeterminado utilizando cálculo de excel (proporción de 1,1,1-trifluoro-2-propanol a etanol > 15). En total 28.5 kg de producto del paso 2 fue obtenido. La composición del producto fue 79.3 m/m-% de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol, 0.7% de 1,1,1-trifluoroacetona, 4.9% de etanol y 15.2% de agua.

c) Tercera destilación

La destilación del producto del paso 2 fue realizada en dos partidas cada una de aproximadamente 14 kg en una columna de rectificación de 5 x 150 cm (Sulzer packing BX) con un matraz de fondo redondo de 20 L. La columna fue equipada con un divisor de reflujo en la parte superior. La destilación fue realizada a la temperatura de baño de 115°C, presión ambiente y temperatura del condensador de 5°C. La proporción de reflujo seleccionado (1: 10 hasta 1: 50) fue dependiente de la calidad del producto obtenido (por monitoreo en Cromatografía de Gas). El tiempo para la retirada del destilado fue 1 segundo. La reunión de las fracciones de producto puro apropiado fue hecha a criterios de pureza preestablecidos utilizando cálculo excel. (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol puro, que contiene 5% de agua azeotrópica y < 0.1% de etanol, destilado de 76.7°C a 76.8°C. La destilación en dos partidas produjo 20.5 kg de producto del paso 3 (criterios: $\geq 90\%$ de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol, $\leq 0.5\%$ de etanol) y 2.2 kg de producto secundario del paso 3 (criterios: $\geq 80\%$ de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol, $\leq 5\%$ de etanol) que a su vez rindió otros 1.4 kg producto del paso 3 después de la redestilación. En total, la destilación fraccionada produjo 21.8 kg de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol purificado.

Propiedades de (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol producido

El producto reunido de las destilaciones (21.8 kg) mostró los siguientes datos analíticos:

Identidad por NMR (CDCl_3) y HPLC/MS: de acuerdo;

Composición (Cromatografía de Gas): 95.1% w/w de TFIP, < 0.1% w/w de TFAC, < 0.1% w/w de etanol;

contenido de agua (Karl-Fisher): 5.2% w/w;

exceso enantiomérico (Cromatografía de Gas quiral): 99.4%.

Referencias

Crawford, J. W. C. *Journal of the Chemical Society (C)* (1967), 2332-2333: Resolution of 1-trifluoromethylethanol. Parte II.

Rosen T.C., Daussmann T., *Chimica Oggi* (2004) Suppl, 43-45: Biocatalyst vs. chemical catalyst for asymmetric reduction. Product list (2004) of Jülich Fine Chemicals GmbH, Jülich (Germany).

Bucciarelli M., Forni A., Moretti I. and Torre G., *Synthesis* (1983) 11, 897-899: Asymmetric reduction of trifluoromethyl and methyl ketones by yeast; an improved method.

Dahl A.C., Fjeldberg M. and Madsen J.O., *Tetrahedron: Asymmetry* (1999) 10,551-559: Baker's yeast: improving the D-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters.

Yasohara Y., Kizaki N., Hasegawa J., Takahashi S., Wada M., Kataoka M., Shimizu S., *Appl Microbiol Biotechnol* (1999) 51: 847-851: Synthesis of optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate by microbial reduction.

Yang Z.-H., Yao S.-J. and Lin D.-Q., *Ind. Eng. Chem. Res.* (2004) 43, 4871-4875: Improving the stereoselectivity of asymmetric reduction of 3-oxo ester to 3-hydroxy ester with pretreatments on bakers' yeast.

Nakamura K., Kondo S., Kawai Y., Hida K., Kitano K. and Ohno A., *Tetrahedron: Asymmetry* (1996) 7, 409-412: enantio- and regioselective reduction of alpha-diketones by baker's yeast.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso biocatalítico graduable para la preparación de S-1,1,1-trifluoro-2-propanol con un exceso enantio-
mérico de > 99% por reducción microbiana asimétrica de 1,1,1-trifluoroacetona con levadura de Baker, **caracterizado**
porque comprende los pasos de

a) calentar una suspensión de levadura de Baker en tampón de fosfato de potasio 0.1-0.4M a 50-52°C durante un
periodo de 60 minutos,

b) mantener esta suspensión a 50-52°C en un período adicional de 90 minutos,

c) diluir la suspensión calentada con tampón a una concentración de levadura de 20-30% peso/volumen y enfriar a
10°C durante 120 minutos,

d) mantener el pH constante de 7.4 a 7.5 por adición automática de la solución de KOH 4M en el proceso completo,

e) agregar 1,1,1-trifluoroacetona a una concentración de 1-5% (peso/volumen) para realizar la biotransformación a
una temperatura debajo del punto de ebullición de 1,1,1-trifluoroacetona,

f) reducir 1,1,1-trifluoroacetona a (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol a una temperatura de 20°C en el plazo de 5 a 8
días, y

g) aislar el (S)-1,1,1-trifluoro-2-propanol mediante una secuencia de pasos de destilación.

2. Proceso biocatalítico de conformidad con la reivindicación 1, en donde la biotransformación es realizada a
temperatura ambiente en un periodo de tiempo de 5-8 días.

3. Proceso biocatalítico de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tampón utilizado es
tampón de fosfato 0.1 M de PH 7-8.

4. Proceso biocatalítico de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración de subs-
trato es 2-4% peso/volumen.

5. Proceso biocatalítico de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizado** porque la concentración de subs-
trato es 3% peso/volumen.

6. Procedimiento de aislamiento de acuerdo a lo descrito en la reivindicación 1, en donde la última etapa de
destilación es una rectificación.