

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003 -758

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 13/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.07.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.08.2000 21.03.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/225695 2001/277531**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**
(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/23113**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/014528**

(71) Přihlašovatel:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, Princeton,
NJ, US;

(72) Původce:

Patel Ramesh N., Bringewater, NJ, US;
Chu Linda, East Brunswick, NJ, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Stereoselektivní redukce substituovaných oxo-
butanů**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu stereoselektivní enzymatické redukce 1-halo-2-oxo-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů s použitím určitých druhů Rhodococcus a Brevibacterium. Produkty, tj. 1-halo-2-hydroxy-3-(chráněné)amino-4-substituované butany jsou použitelné jako meziprodukty v syntéze sloučenin, které jsou inhibitory ACE, reninu a HIB proteáz, jsou získány ve vysokém výtěžku a zejména o velmi vysoké diastereomerní čistotě. Způsob je výhodně vysoce selektivní pro 1S, 2S enantiomer produktu.

CZ 2003 - 758 A3

Stereoselektivní redukce substituovaných oxo-butanůVzájemné odkazy na související přihlášky

Tato přihláška nárokuje výhody podle U.S. prozatimní přihlášky č. 60/277 531, podané 21.3.2001, a přihlášky č. 60/225 695, podané 16.8.2000.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nového způsobu přípravy (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů stereoselektivní redukcí odpovídajících oxo sloučenin. Substituované butany, produkované způsobem podle vynálezu, jsou prekursory hydroxyethylaminových isosterních podjednotek, přítomných v mnoha molekulách, které jsou terapeuticky vhodné jako inhibitory enzymů konvertujících angiotensin (angiotensin converting enzyme, ACE), reninu a HIV-proteázy.

Dosavadní stav techniky

Bing-nan Zhou et al., J.Am.Chem.Soc., 105, 5926-5928, 1983 popisuje chemomikrobiologickou syntézu L-karnitinu, který hraje významnou úlohu v lidském metabolismu a transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Konkrétně, tato práce uvádí redukci pomocí pekařských kvasinek, tj. *Saccharomyces cerevisiae*, ethyl K-chloracetoctanu na ethyl(S)-4-chlor-3-hydroxybutanoát.

Kazutoshi Ushio et al., Tetrahedron Letters, Vol.27, No.23, 2657-2660, 1986 popisuje redukci beta-keto esterů pomocí kvasinek rostoucích na methanolu. Tato práce uvádí, že předmětná reakce způsobuje dramatický enantiomerní posun

k přebytku D-izomeru ve výsledném produktu. Tento fenomén byl získán, jestliže byla reakce prováděna s použitím kvasinek rostoucích na methanolu, díky enzymům charakteristickým pro kvasinky pěstované v takových médiích.

Markus Christen et al., J.Chem.Soc., Chem.Comm., 264-266, 1988, uvádí syntézu čtyř stereoizomerů methyl-6-(p-chlorfenylthio)-3,4-dihydrohexanoátu, ve které bylo nejdůležitější zavedení chiraloty uskutečněno vhodnou redukcí kvasinkami. Předpokládá se, že ačkoliv redukce beta-keto esterů kvasinkami byla intenzivně studována, zůstává nadále obtížným předpovědět buďto absolutní konfiguraci produktu (produktů), nebo zejména pravděpodobnost získání enantiomerního nadbytku.

Antonio Trincone et al., Biotechnology and Bioengineering, Vol. 35, 559-564, 1990 popisuje asymetrickou redukcí ketonu buňkami, které se nedělí, *Sulfolobus solfataricus*. Uvádí se, že redukční schopnost nedělicích se buněk tohoto organismu silně závisí na fázi buněčného růstu.

Ramesh Patel et al., Enzyme Microb. Technol., Vol.13, 906-912, 1991 popisuje stereospecifickou mikrobiální redukcí 4,5-dihydro-4-(4-methoxyfenyl)-6-(trifluormethyl-1H-1)-benzazepin-2-onu. Konkrétně se uvádí, že klíčový meziproduct (3R-cis)-1,3,4,5-tetrahydro-3-hydroxy-4-(4-methoxyfenyl)-6-(trifluormethyl)-2H-1-benzazepine-2-on byl připraven stereoselektivní mikrobiální redukcí odpovídajícího ketonu. Předpokládá se, že výběrem specifických podmínek je možné získat jeden izomer ze čtyř známých možností.

Ramesh Patel et al., Enzyme Microb. Technol., Vol. 15, 1014-1021, 1993, popisuje stereoelektivní redukcí di-keto sloučeniny, methyl esteru kyseliny 3,5-dioxo-6-

(benzyloxy)hexanové na jediný enantiomer výsledné dihydroxy sloučeniny.

Ramesh Patel et al., Enzyme Microb. Technol., Vol.14, 731-738, 1992 popisuje postup tepelného ošetření *Geotrichum candidum* ke zvýšení optické čistoty hydroxy produktu, získaného redukcí odpovídajících beta-keto esterů.

Kometani et al., Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 80, No. 2, 208-210, 1995, popisuje kvasinkami zprostředkovanou bioredukcí s použitím ethanolu jako zdroje energie. Byl sledován vztah mezi rychlostí spotřeby ethanolu a rychlostí redukce prochirálního ketonu pekařskými kvasinkami se závěrem, že ethanol by mohl být použitelný k produkci chirálních alkoholů z prochirálních ketonů ve velkém měřítku.

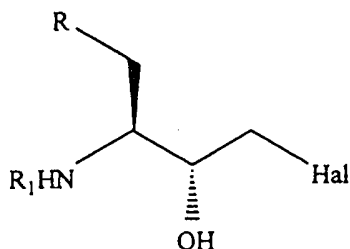
Ramesh Patel et al., U.S. Patent č. 5 391 495, vydaný 21.2.1995, popisuje stereoselektivní redukci určitých sulfonamidových sloučenin obsahujících ketoskupiny pro tvorbu odpovídajících sloučenin obsahujících hydroxylovou skupinu s použitím mikroorganismů nebo enzymů schopných katalyzovat redukci. Jmenovanými enzymy jsou oxido-reduktáza nebo dehydrogenáza a mikroorganismy jsou přednostně vybrány z druhů *Hansenula*, *Rhodococcus* a *Nocardia*.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je zaměřen na nový stereoselektivní způsob přípravy (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů redukcí odpovídajících sloučenin obsahujících ketoskupinu určitými druhy *Rhodococcus* a *Brevibacterium*. Produkty jsou získány ve vysokém výtěžku a o vynikající diastereomerní čistotě.

Podrobný popis vynálezu

Způsob podle předkládaného vynálezu poskytuje výhodnou syntézu (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-



(I),

kde Hal je halogen, výhodně chlor, R je vybrán ze skupiny sestávající z alkyly, substituovaného alkyly, arylu a substituovaného arylu a R₁ je chránicí skupina aminofunkce.

Substituované butany vzorce I jsou užitečné jako meziprodukty v syntéze molekul, které jsou inhibitory ACE, reninu a HIV proteáz. Aktivita takových molekul proti HIV proteázám je čini hodnotnými v ošetření retrovirálních infekcí, jako je AIDS. Takové sloučeniny a jejich použití jsou například popsány v U.S. Patentu č. 5 849 911, jehož popis je zde uveden jako odkaz. Zvláště významnou AIDS sloučeninou popsanou v U.S. Patentu č. 5 849 911 je dimethyl ester [3S-(3R*, 8R*, 9R*, , 12R*)]-3,12-bis(1,1-dimethylethyl)-8-hydroxy-4,11-dioxo-9-(fenylmethyl)-6{[4-(2-pyridyl)fenyl]methyl}-2,3,6,10,13-pentaazatetradekandiové kyseliny. Tato sloučenina může být přímo syntetizována z (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-sustituovaných butanů znázorněných vzorcem I. Skutečnost, že způsob podle předkládaného vynálezu produkuje velmi vysoký výtěžek trans (1S,2S) enantiomeru substituovaných butanů vzorce I, čini vynález významným pro konečnou účinnost syntézy terapeutické výše popsané sloučeniny.

Následně jsou uvedeny definice používaných termínů. Výraz „alkyl“ znamená případně substituovaný přímý nebo rozvětvený nasycený uhlovodíkový řetězec mající od 1 do 7 uhlíkových atomů, přednostně 1 až 4 uhlíkové atomy. Výraz „nižší alkyl“ znamená případně substituované alkylové skupiny mající 1 až 4 uhlíkové atomy.

Výraz „substituovaný alkyl“ znamená alkylovou skupinu substituovanou například jedním nebo čtyřmi substituenty, jako je halogen a skupiny trifluormethyl, trifluormethoxy, hydroxy, alkoxy, cykloalkoxy, heterocyklyloxy, oxo, alkanoyl, aryl, aryloxy, aralkyl, alkanoyloxy, amino, alkylamino, dialkylamino, arylamino, aralkylamino, cykloalkylamino, heterocykloamino a distubstituovaná amino skupina. Zde uvedené definice pro alkyl a substituovaný alkyl jsou rovněž platné pro alkylové podíly alkoxy skupin.

Výraz „aryl“ znamená monocyklické nebo bicyklické aromatické uhlovodíkové skupiny mající od 6 do 12 atomů uhlíku v kruhu, jako je například fenylová, naftylová, bifenylová a difenylová skupina, z nichž každá může být substituována.

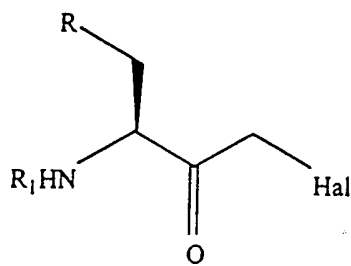
Výraz „substituovaný aryl“ znamená arylovou skupinu substituovanou například jedním nebo čtyřmi substituenty, jako je alkyl, substituovaný alkyl, halogen a skupiny trifluormethyl, trifluormethoxy, hydroxy, alkoxy, cykloalkoxy, heterocyklyloxy, alkanoyl, alkanoyloxy, amino, alkylamino, dialkylamino, aralkylamino, cykloalkylamino, heterocyklylthio, ureido, nitro, kyano, karboxy, karboxyalkyl, karbamyl, alkoxykarbonyl, alkylthio, arylthio, alkylsulfonyl, sulfonamido, aryloxy a podobně.

Výraz „halogen“ nebo „Hal“ znamená chlor, brom, fluor a jod, přednostně chlor.

Výraz „chránicí skupina aminofunkce“ znamená v oboru známou skupinu sloučenin, které mohou být připojeny

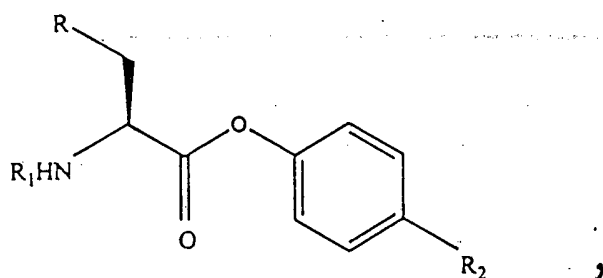
k aminoskupině tak, aby bylo zabráněno zahrnutí aminoskupiny do reakce probíhající kdekoliv v molekule sloučeniny, k níž je připojena. Preferovanou skupinou je t-butoxykarbonyl (BOC), nicméně v oboru známé funkční chránicí skupiny, obecně alkoxykarbonylové skupiny, jako je benzyloxykarbonyl, mohou být rovněž použity.

Výchozími sloučeninami pro předmětný způsob přípravy (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů znázorněných vzorcem I jsou odpovídající sloučeniny obsahující keto-skupinu znázorněné vzorcem II

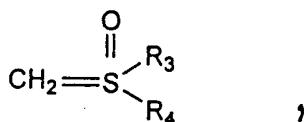


(II),

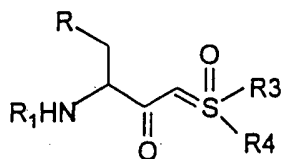
kde Hal, R a R_1 jsou definovány výše. Sloučeniny znázorněné vzorcem II mohou být připraveny technikami popsány v literatuře a běžně známými odborníkům v oboru. Výhodný způsob pro přípravu sloučenin vzorce II je popsán v souběžně projednávané patentové přihlášce Docket GY55, jejíž popis je zde zahrnut jako odkaz. Podle této metody je aryl ester znázorněný vzorcem



ve kterém R a R₁ byly definovány výše, R₂ je vodík nebo nitroskupina a může být substituován v ortho nebo para pozici na fenylovém kruhu, reaguje se sirným ylidem, tj. sloučeninou obsahující funkci znázorněnou vzorcem



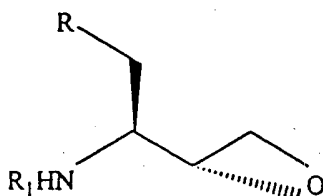
k získání intermediární keto-ylidové sloučeniny vzorce



kde R a R₁ byly definovány výše, R₃ a R₄ jsou vybrány ze skupiny sestávající z alkyly, substituovaného alkyly a arylu. Keto-ylidová sloučenina znázorněná vzorcem výše je pak přeměněna na keto-skupinu obsahující sloučeniny znázorněné vzorcem II reakcí se zdrojem chloru, přednostně s bazickým zdrojem chloru, nejvýhodněji chloridem lithným a organickou kyselinou, např. kyselinou methansulfonovou.

(1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněné)amino-4-substituované butany znázorněné vzorcem I jsou významnými meziprodukty syntézy molekul, které jsou inhibitory ACE, reninu a HIV proteáz. Aktivita takových molekul proti HIV proteázám je číni hodnotnými v ošetření retrovirálních infekcí, jako je AIDS. Konkrétně, na (1S,2S)-1-halo-2-

hydroxy-3-(chráněné)amino-4-substituované butany vzorce I se působí vhodnou bází k jejich přeměně na odpovídající epoxidy znázorněné vzorcem uvedeným níže



Epoxidové sloučeniny výše uvedeného vzorce jsou meziprodukty, které mohou být přeměněny na významnou AIDS sloučeninu dimethyl ester [3S-(3R*,8R*,9R*,12R*)]-3,12-bis(1,1-dimethylethyl)-8-hydroxy-4,11-dioxo-9-(fenylmethyl)-6-[4-(2-pyridyl)fenyl]methyl}-2,3,6,10,13-pentaazatetradekandiové kyseliny, popsanou v U.S.Patentu č. 5 849 911, který je zde uveden jako odkaz.

Stereoselektivní redukce (1S)-1-halo-2-oxo-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů vzorce II uvedeného výše pro tvorbu (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů znázorněných vzorcem I je podle předkládaného vynálezu prováděno reakcí s oxidoreduktázovým enzymem schopným katalyzovat enzymatickou reakci ketonů vzorce II. Buňky mikroorganismů mohou být ve formě intaktních vlhkých nebo sušených buněk, jako jsou buňky lyofilizované, sprejově sušené nebo tepelně sušené, nebo mohou být ve formě upraveného buněčného materiálu, jako rozrušené buňky, nebo buněčné extrakty. Zatímco je znám velký počet mikroorganismů, které poskytují některé z forem oxidoreduktáz, bylo podle předkládaného vynálezu nalezeno, že pouze vybrané druhy *Rhodococcus* a *Brevibacterium* katalyzují redukci sloučeniny vzorce II za tvorby požadovaných (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů ve vysokém

kvantitativním a enanciomerním výtěžku. Těmtito druhy jsou *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, *Rhodococcus erythropolis* DSM 6971 a *Rhodococcus sp.* ATCC 21227, *Rhodococcus erythropolis* ATCC 27854 a *Brevibacterium sp.* ATCC 19653. Zde použitý termín ATCC znamená přírůstkové číslo uložení konkrétního mikroorganismu v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852. Výraz DSM znamená German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

Metoda enzymatické redukce podle předkládaného vynálezu může být prováděna následně po fermentaci zúčastněného mikroorganismu, tj. jako dvoustupňová sestávající z fermentace a redukce, nebo jako souběžná, tj. jako jednostupňová nebo *in situ* fermentace a redukce. Ve druhém případě může být mikroorganismus pěstován ve vhodném médiu, zejména obsahujícím zdroj dusíku a uhlíku, dokud není dosaženo postačujícího růstu, a pak je přidána sloučenina vybraná ze sloučenin vzorce II. Enzymatická redukce pak pokračuje, dokud není dosaženo skutečné kompletní přeměny sloučeniny vzorce II.

Ve dvoustupňovém postupu je mikroorganismus nejprve pěstován ve vhodném médiu popsaném výše, dokud nevykazuje předem stanovenou hladinu enzymatické aktivity, v tomto bodě jsou buňky sklizeny běžnou separační technikou a jsou připraveny suspenze mikrobiálních buněk obsahující vhodná pufrací činidla apod. Vhodná pufrací činidla zahrnují fosfátové pufr, zejména draselný fosfátový pufr, tris-HCl, octan sodný apod. Rovněž voda může být použita pro přípravu suspenze mikrobiálních buněk. Sloučenina vzorce II je pak přidána a enzymatická redukce pokračuje, dokud není dosaženo kompletní přeměny. V jiném provedení zahrnuje vhodné růstové médium, jak bylo dříve uvedeno, zdroje uhlíku a dusíku a stopové prvky. Rovněž mohou být přidány

induktory. Jak je odborníkům v oboru známo, výraz induktor znamená jakoukoliv sloučeninu iniciující nebo zvyšující požadovanou enzymatickou, tj. oxidoreduktázovou, aktivitu uvnitř buňky pro produkci požadovaného produktu. (1S)-1-halo-2-oxo-3-(chráněné)amino-4-substituované butany vzorce II mohou být považovány za induktor, zejména, jsou-li přidány v malých množstvích během růstu mikroorganismů.

Vhodné zdroje uhlíku pro médium zahrnují cukry, jako je maltóza, laktóza, glukóza, fruktóza, glycerol, sorbitol, sacharóza, škrob, mannitol, propylenglykol apod., organické kyseliny a jejich soli, jako je octan sodný, citronan sodný, apod., aminokyseliny a jejich soli, jako je glutamát sodný apod., alkoholy, jako je ethanol, propanol apod. Vhodné zdroje dusíku mohou zahrnovat N-Z amin A, kukuřičný výluh, sójovou mouku, hovězí extrakty, kvasničné extrakty, melasu, pekařské kvasnice, trypton, nutrisoy, pepton, yeastamin, dusičnan sodný, síran amonný apod. Vhodné stopové prvky mohou zahrnovat fosfáty a soli s hořčíkem, manganem, vápníkem, kobaltem, niklem, železem, sodíkem a draslíkem. Vhodná použitá média podle vynálezu mohou zahrnovat množství složek vybraných z jakékoliv těchto kategorií. Reprezentativní výhodná média zahrnují bez omezení vodná média obsahující v hmotnostních procentech následující složky:

| Složka | Hmotnostní procenta |
|-----------------------------|---------------------|
| č.1 sladový extrakt | 1 % |
| pH 7,0 kvasničný extrakt | 1 % |
| pepton | 1 % |
| glukóza | 2 % |
| č.2 sladový extrakt | 1 % |
| pH 7,0 kvasničný extrakt | 1 % |

| | | |
|--------|-------------------|-------|
| | pepton | 0,3 % |
| | glukóza | 4 % |
| č.3 | sladový extrakt | 1 % |
| pH 7,0 | kvasničný extrakt | 1 % |
| | pepton | 0,3 % |
| | glukóza | 2 % |
| č.4 | sladový extrakt | 1 % |
| pH 7,0 | kvasničný extrakt | 1 % |
| | pepton | 0,3 % |
| | sukcinát sodný | 2 % |

Hodnota pH uvedená výše platí pro média po sterilizaci. Před sterilizací je pH přednostně upravováno na od přibližně 6 do 8, výhodně přibližně na hodnotu pH 6,5. Pak jsou média sterilizována, například zahříváním při teplotě přibližně 121 °C po dobu 30 minut. Po sterilizaci je pH médií upraveno na pH 6,5 až 7,5, výhodně přibližně 7,0. Během mikrobiálního růstu a procesu redukce je pH udržováno mezi přibližně 4,0 až 9,0, výhodně mezi přibližně pH 6,0 a 8,0. Pro úpravu pH mohou být s výhodou použity vhodné zásady nebo kyselé soli z výše uvedených složek.

Teplota reakční směsi je mírou tepelné energie dostupné pro proces redukce, a proto by měla být vhodná teplota procesu udržována k zajištění dostupnosti jejího dostatku až k ukončení reakce. Vhodné teplotní rozmezí způsobu podle vynálezu je rozmezí od přibližně 15 °C do přibližně 60 °C, výhodně od přibližně 25 °C do přibližně 40 °C. Není známo, že by tlak byl kritickým pro provedení způsobu podle vynálezu a běžně je udržován přibližně atmosférický tlak.

Způsob podle předkládaného vynálezu je přednostně prováděn za aerobních podmínek. Pro předmětný způsob jsou míchání a aerace reakční směsi rovněž prospěšné proto, že ovlivňují dostupnost kyslíku pro biotransformaci. Způsob je výhodně prováděn například v třepaných lahvoých kulturách nebo fermentačních tancích během růstu mikroorganismů v jednostupňovém nebo dvoustupňovém procesu popsáném výše. Je preferováno míchání v rozsahu přibližně 50 až 1 000 otáček za minutu, nejvýhodněji pak přibližně 50 až 500 otáček za minutu. Výhodné provedení aerace je od přibližně 0,1 do 10 objemů vzduchu na objem média za minutu, s nejvýhodnějším provedením přibližně 5 objemů na objem média za minutu.

Kompletní konverze sloučeniny vzorce II může požadovat například od přibližně 4 do 48 hodin, běžně od přibližně 4 do 24 hodin, měřeno od doby přidání sloučeniny vzorce II k médiu. Je upřednostňováno, aby média byla na bázi vody, ačkoliv i organické kapaliny nebo mísitelné či nemísitelné, tj. dvojfázové směsi organická fáze/vodná fáze, mohou být stejně dobře použity.

Způsob stereoselektivní enzymatické redukce podle předkládaného vynálezu může být prováděn s použitím kofaktoru, jako je nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), zejména tehdy, jestliže je použit izolovaný enzym. NADH může být například následně regenerován a opětovně použit. Může být použit další enzym, který regeneruje NADH in situ, jako je formiat dehydrogenáza nebo glukóza dehydrogenáza. Vhodné donory vodíku zahrnují, molekulární vodík, formiat (tj. formiat alkalického kovu nebo ammonium formiat), glukóza, fosfornan nebo elektrochemická redukce v přítomnosti viologenu, např. methyl viologenu. Rovněž je možné regenerovat NADH bez použití dalších enzymů s použitím například ethanolu nebo formiatu.

Dalším výhodným provedením je přidání sloučeniny vzorce II do reakčního média v množství od přibližně 0,2 % do přibližně 5 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost výchozí sloučeniny a média. Inokulum mikroorganismu je vzhledem k množství výchozího materiálu dostačující k poskytnutí enzymatické redukce sloučeniny vzorce II v časech výše uvedených, obecně od přibližně 5 % hmotnostních do přibližně 30 % hmotnostních koncentrace buněk. Použití preferovaných reakčních parametrů popsaných výše s danými mikroorganismy poskytuje reakční výtěžek vyšší než 70 %, optimálně až 99 %, a o neočekávané diastereomerní čistotě vyšší než 93 %, optimálně až 99 % požadovaného enantiomeru sloučeniny vzorce I. Produkt redukčního způsobu podle předkládaného vynálezu, tj. sloučeniny vzorce I, mohou být získány jakoukoliv vhodnou metodou izolace a/nebo purifikace, tj. metodami, jako je extrakce, destilace, krystalizace, sloupcová chromatografie a podobně.

Je pochopitelné, že další provedení nebo modifikace v provedení vynálezu jsou zřejmé a mohou být snadno proveditelné odborníkem v oboru bez odchýlení se od rozsahu a ducha výše popsaného vynálezu. Proto není zamýšleno, aby rozsah zde připojených nároků byl limitován exaktním popisem uvedeným výše, nároky jsou spíše konstruovány tak, aby obsahovaly všechny znaky patentovatelné novosti předkládaného vynálezu, včetně všech znaků a provedení, které odborník v příslušném oboru považuje za ekvivalentní vynálezu. Vynález je dále popsán odkazy na následující experimentální provedení.

Příklady provedeníPříklad 1Stereoselektivní enzymatická redukce: Použití celých buněk-
jednostupňový způsob

Buňky *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 (1 ml) byly inokulovány do 100 ml Média 1, jak bylo popsáno výše, v 500ml lahvích a inkubovány při 28 °C a 200 RPM (otáčkách za minutu) na třepačce po dobu 22 hodin. Bylo upraveno pH 50 buněčné živné půdy na hodnotu 7,0 pomocí 1M draselného fosfátového pufru. K buněčnému médiu byla přidána glukóza v množství 25 mg/ml a 50 mg (1S)-[N-(1-benzyl-2-oxo-3-chlor)propyl]t-butyl esteru kyseliny karbamové jako substrátu. Biotransformace (redukce) byly prováděny při 28 °C a 200 RPM na třepačce. V předem stanovených časech byly reakce ve směsi zastaveny dvěma objemy t-butyl-methyl etheru a toluenu v poměru 60:40, a oddělená organická fáze byla filtrována přes 0,2 mikronový filtr a shromážděna. Dva ml organické fáze byly odpařeny k usušení pod proudem dusíku a zbytek byl rozpuštěn v acetonitrilu, filtrován a analyzován pomocí HPLC na t-butyl ester (1S,2S)-[N-(1-benzyl-2-hydroxy-3-chlor)propyl] kyseliny karbamové (produkt). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1

| Mikroorganismus | Reakční doba (hodiny) | Substrát (mg/ml) | Produkt (mg/ml) | Diastereomerní čistota (%) |
|---------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|----------------------------|
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 21 | 0,45 | 0,48 | >98 |
| ATCC 4277 | 93 | 0,05 | 0,95 | >98 |

Příklad 2

Substrát a produkt byly shodné jako v Příkladu 1. Buňky *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 a *Rhodococcus erythropolis* DSM 6971 (1 ml) byl jednotlivě inokulovány do 100ml podílů Média 1, jak bylo uvedeno výše, do 500ml lahví a inkubovány při 25 °C při 280 RPM na třepačce po dobu 48 hodin. Jedno sto ml každé kultury bylo inokulováno do 15 ml Média 1 ve fermentoru. Růst ve fermentoru probíhal při 25°C, aeraci 15 LPM (litrů za minutu) a míchání 500 RPM po dobu 36 hodin. Buňky byly z fermentoru sklizeny a použity pro enzymatickou konverzi (biotransformaci) t-butyl esteru (1S)-[N-(1-benzyl-2-oxo-3-chlor)propyl] kyseliny karbamové (substrát) na t-butyl ester (1S,2S)-[N-(1-benzyl-2-hydroxy-3-chlor)propyl]kyseliny karbamové (produkt). Buněčné suspenze byly připraveny suspendováním buněk, 200 gramů ve 100 ml draselného fosfátového pufru, pH 7,0. Ke každé suspenzi bylo přidáno 25 mg/ml glukózy a předem byla

stanovena koncentrace substrátu. Biotransformace substrátu na produkt byla prováděna při 28 °C na třepačce při 160 RPM. V předem stanovených časech byly reakce ve směsi zastaveny a získaný produkt byl analyzován, jak je popsáno u Příkladu 1. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2

| Mikroorganismus | Reakční doba (hodiny) | Použitý substrát (mg/ml) | Substrát (mg/ml) | Produkt (mg/ml) | Diastereo- merní čistota (%) |
|--|-----------------------|--------------------------|------------------|-----------------|---------------------------------|
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 | 20 | 1,0 | 0 | 0,86 | >98 |
| | 32 | 5 | 0,02 | 4,9 | >98 |
| | 49 | 10 | 0,05 | 9,65 | >98 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 6971 | 20 | 1 | 0 | 0,95 | >98 |
| | 24 | 5 | 0 | 4,83 | >98 |
| | 46 | 10 | 0 | 9,2 | >98 |

Výsledky v Tabulce 1 a 2 demonstrují, že požadovaný produkt je získán způsobem podle vynálezu ve vysokém výtěžku a o velmi vysoké diastereomerní čistotě.

Příklad 3Použití různých mikrobiálních kmenů pro biotransformaci:
celé buňky

Pro biotransformaci byla použita řada mikroorganismů způsobem podle Příkladu 1. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3

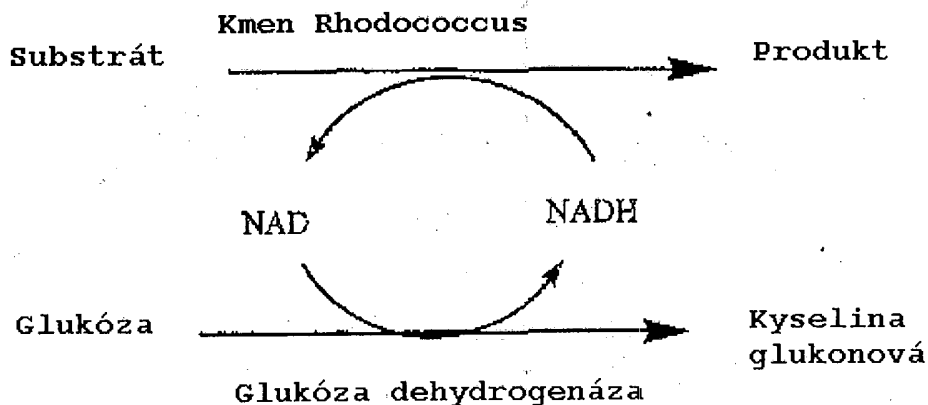
| Mikroorganismus | Kultura ID | Substrát vstup mg/ml | Výtěžek (%) | Diastereomerní čistota (%) |
|----------------------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------------|
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ATCC 33970 | 1 | 25,4 | 75,8 |
| <i>Brevibacterium sp.</i> | ATCC 19653 | 2 | 100 | 93,9 |
| <i>Hansenula anomala</i> | ATCC 8170 | 1 | 31,8 | 76,2 |
| <i>Hansenula anomala</i> | ATCC 58044 | 1 | 33,1 | >98 |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | ATCC 34438 | 1 | 37,6 | 79,2 |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | ATCC 26012 | 1 | 6,1 | >98 |
| <i>Hansenula saturnus</i> | ATCC 16762 | 1 | 35,1 | >98 |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | ATCC 29351 | 1 | 5,2 | -- |
| <i>Pseudomonas species</i> | ATCC 202027 | 1 | 5,1 | -- |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | ATCC 4277 | 2 | 74,2 | >98 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | ATCC 27854 | 2 | 77,7 | >98 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | ATCC 25544 | 2 | 61,1 | >98 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | DSM 6971 | 2 | 100 | >98 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | DSM 6977 | 2 | 72,8 | >98 |
| <i>Rhodococcus maris</i> | ATCC 35013 | 2 | 16,6 | >98 |
| <i>Rhodococcus rhodococcus</i> | ATCC 14347 | 2 | 66,2 | 61,9 |
| <i>Rhodococcus rhodococcus</i> | ATCC 21197 | 2 | 14,0 | -- |
| <i>Rhodococcus species</i> | ATCC 15592 | 2 | 91,2 | >98 |
| <i>Rhodococcus species</i> | ATCC 29673 | 2 | 32,5 | >98 |
| <i>Rhodococcus species</i> | ATCC 21227 | 2 | 100 | >98 |
| <i>Rhodococcus species</i> | ATCC 21146 | 2 | 42,7 | >98 |
| <i>Rhodococcus species</i> | ATCC 19071 | 2 | 14,3 | -- |
| <i>Rhodococcus species</i> | ATCC 21226 | 2 | 56,6 | >98 |
| <i>Trichoderma viridae</i> | ATCC 20536 | 1 | 12,2 | >98 |

Výsledky v Tabulce 3 prokazují, že podle vynálezu mikroorganismy jasně způsobují produkci produktu v přijatelných výtěžcích, tj. více než 70%, a o přijatelné diastereomerní čistotě, tj. více než 90%.

Příklad 4Použití buněčného extraktu a kofaktoru

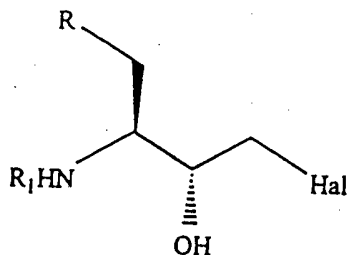
Substrát a produkt pro tento postup byl shodný jako v předchozích příkladech. Buňky *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 rostly na Médiu 1, jak bylo popsáno výše. Buňky (150 gramů) byly suspendovány ve 100 ml draselného fosfátového pufru, pH 7,0. Suspenze buněk byly dezintegrovány při 4 °C s použitím mikrofluidizéru při tlaku 13 000 psi. Dezintegrovaná buněčná suspenze byla centrifugována při 12 000 RPM po dobu 30 minut. Čistý supernatant („buněčný extrakt“) byl použit pro biotransformaci substrátu na produkt.

Podíly (10 ml) buněčných extraktů byly doplněny 10 mg substrátu, glukóza dehydrogenázou (35 jednotek), 0,7 mM NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) a 200 mg glukózy. Reakce byla prováděna v pH statu při pH 6,0, míchání 150 RPM a teplotě 30 °C. Vzorky byly periodicky odebírány z reakčního média a analyzovány. Produkt byl získán ve výtěžku 95 % a o diastereomerní čistotě vyšší než 98 %. V tomto příkladu byl NADH kofaktor regenerován s použitím glukóza dehydrogenázy, NAD⁺ a glukózy, jak je uvedeno níže.



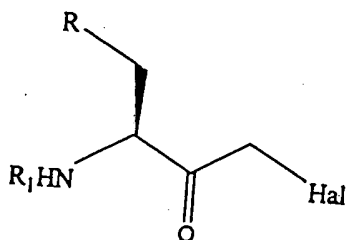
Patentové nároky

1. Stereoselektivní způsob přípravy (1S,2S)-1-halo-2-hydroxy-3-(chráněných)amino-4-substituovaných butanů vzorce



(I),

kde Hal je halogen, R je vybrán ze skupiny sestávající z alkyly, substituovaného alkyly, arylu a substituovaného arylu a R₁ je chránicí skupina aminofunkce, zahrnující uvedení do kontaktu (1S)-1-halo-2-oxo-3-(chráněného)amino-4-substituovaného butanu vzorce II



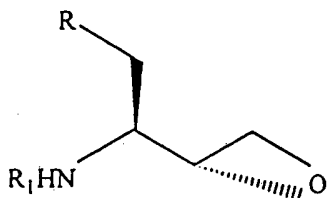
(II),

kde Hal, R a R₁ mají výše uvedený význam, s mikroorganismem schopným katalyzovat stereoselektivní redukci sloučeniny vzorce II, ve kterém uvedený mikroorganismus je vybrán ze skupiny sestávající z *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, *Rhodococcus erythropolis* DSM 6971 a *Rhodococcus* sp. ATCC 21227, *Rhodococcus erythropolis* ATCC 27854 a *Brevibacterium* sp. ATCC 19653 za takových podmínek, že se uskuteční redukce a získá se uvedená sloučenina vzorce I.

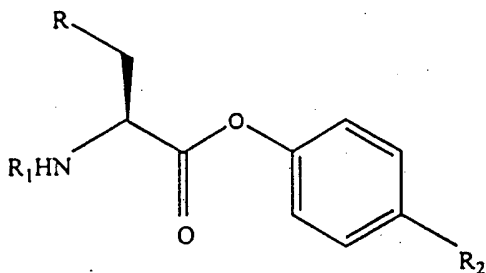
2. Způsob podle nároku 1, kde Hal je chlor, R je fenyl a R₁ je t-butoxykarbonyl.
3. Způsob podle nároku 1, kde řečený mikroorganismus je *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277.
4. Způsob podle nároku 1, kde řečený mikroorganismus je *Rhodococcus erythropolis* DSM 6971.
5. Způsob podle nároku 1, kde řečený mikroorganismus je *Rhodococcus sp.* ATCC 21227.
6. Způsob podle nároku 1, kde řečený mikroorganismus je *Rhodococcus erythropolis* ATCC 27854.
7. Způsob podle nároku 1, kde řečený mikroorganismus je a *Brevibacterium sp.* ATCC 19653.
8. Způsob podle nároku 1 prováděný jako jednostupňová fermentace.
9. Způsob podle nároku 1 prováděný jako dvoustupňová fermentace.
10. Způsob podle nároku 1 prováděný v přítomnosti induktoru.
11. Způsob podle nároku 10, ve kterém induktorem je sloučenina vzorce I, která je přidána během růstu mikroorganismu.
12. Způsob podle nároku 1, kde sloučenina vzorce I je získána v alespoň 70% výtěžku a o alespoň 93% diastereomerní čistotě.

13. Způsob podle nároku 10, kde sloučenina vzorce I je získána v alespoň 95% výtěžku a o alespoň 99% diastereomerní čistotě.

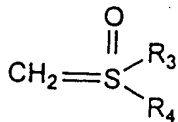
14. Způsob přípravy epoxy sloučeniny vzorce



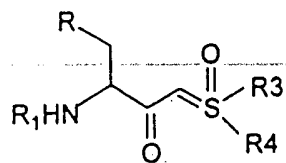
kde R je vybrán ze skupiny sestávající z alkyly, substituovaného alkyly, arylu a substituovaného arylu a R₁ je chránicí skupina aminofunkce, zahrnující reakci aryl esteru znázorněného vzorcem



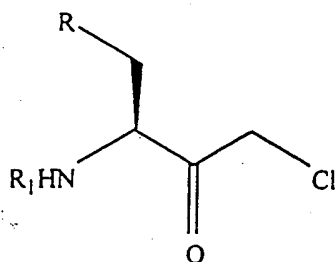
kde R a R₁ mají výše uvedený význam a R₂ je vodík nebo skupina nitro, a může být substituován v ortho nebo para pozici na fenylovém kruhu s jinou ylidovou sloučeninou obsahující funkci znázorněnou vzorcem



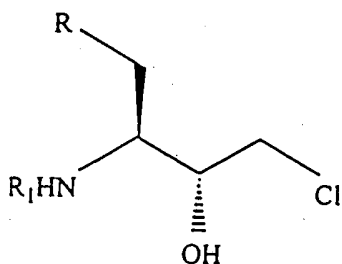
kde R₃ a R₄ jsou vybrány ze skupiny sestávající z alkyly, substituovaného alkyly a arylu, za vzniku intermediární keto ylidové sloučeniny znázorněné vzorcem



kde R, R₁, R₃ a R₄ mají význam uvedený výše, působení na řečenou sloučeninu vzorce III zdrojem chloru a organickou kyselinou za vzniku 1-substituované-2-amino-3-oxo-4-chlorbutanové sloučeniny znázorněné vzorcem



kde R a R₁ mají význam uvedený výše, redukcí řečené sloučeniny za vzniku 1-chlor-2-hydroxy-3-amino-4-substituované butanové sloučeniny znázorněné vzorcem



kde R a R₁ mají význam definovaný výše, a reakci řečené hydroxy sloučeniny s bází za vzniku řečené epoxy sloučeniny, se zlepšením, kde redukce řečeného 1-chlor-2-oxo-3-amino-4-substituovaného butanu je prováděna podle nároku 1 s výtěžností 1-chlor-2-hydroxy-3-amino-4-substituované butanové sloučeniny alespoň 70 % a o alespoň 93% diastereomerní čistotě.

15. způsob podle nároku 14, kde sloučenina vzorce I je získána v alespoň 95% výtěžku a o alespoň 99% diastereomerní čistotě.