

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

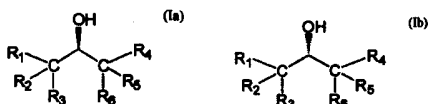
(21) Anmeldenummer: **A 1808/2004** (51) Int. Cl.⁸: **C07C 29/143** (2006.01),
(22) Anmeldetag: **27.10.2004** **C07C 231/12** (2006.01),
(43) Veröffentlicht am: **15.12.2006** **C12P 7/04** (2006.01),
C12P 13/02 (2006.01)

(73) Patentanmelder:

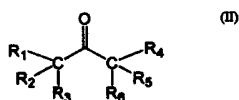
IEP GMBH
D-65203 WIESBADEN (DE)

(54) **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CHIRALEN ALKOHOLEN**

(57) Bei einem Verfahren zur Herstellung eines enantiomerenreinen Alkohols der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib



wobei R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 jeweils Wasserstoff, Halogen, eine C_1 - C_6 -Alkyl- oder C_1 - C_6 Alkoxygruppe repräsentieren, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 von den übrigen fünf verschieden ist, sowie der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 ein Halogen ist, wird ein Keton der allgemeinen Formel II



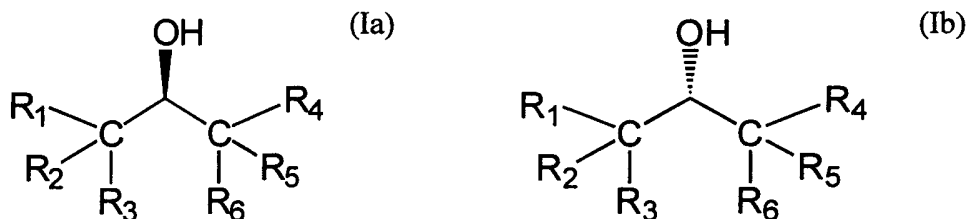
wobei R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 die oben angegebene Bedeutung besitzen, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird.



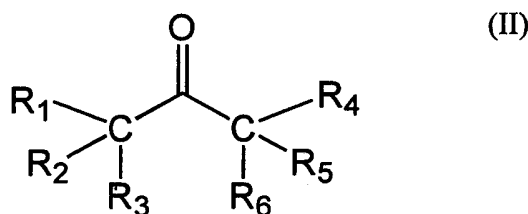
Zusammenfassung:

Verfahren zur Herstellung von chiralen Alkoholen

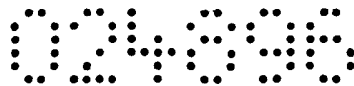
Bei einem Verfahren zur Herstellung eines enantiomerenreinen Alkohols der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib



wobei R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 jeweils Wasserstoff, Halogen, eine C_1 - C_6 -Alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkoxygruppe repräsentieren, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 von den übrigen fünf verschieden ist, sowie der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 ein Halogen ist, wird ein Keton der allgemeinen Formel II

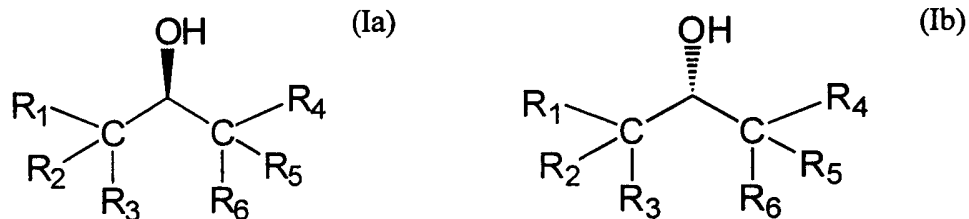


wobei R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 die oben angegebene Bedeutung besitzen, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird.



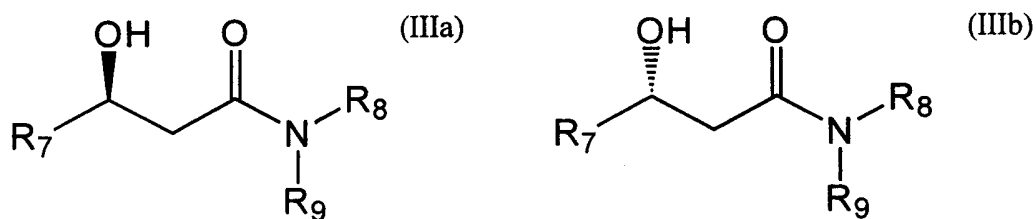
Verfahren zur Herstellung von chiralen Alkoholen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner Alkohole der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib



wobei R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 jeweils Wasserstoff, Halogen, eine C_1 - C_6 -Alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkoxygruppe repräsentieren, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 von den übrigen fünf verschieden ist, sowie der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 ein Halogen ist.

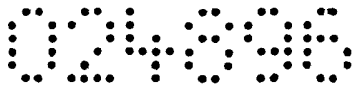
Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner Alkohole der allgemeinen Formel IIIa bzw. IIIb



wobei R_7, R_8 und R_9 eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe repräsentieren.

Enantiomerenreine Alkohole der allgemeinen Formeln Ia bzw. Ib und IIIa bzw. IIIb stellen wertvolle chirale Bausteine für die Synthese einer Vielzahl von chiralen Verbindungen dar, welche für die Herstellung von pharmazeutisch wirksamen Substanzen von Interesse sind. Viele dieser enantiomerenreinen Alkohole sind jedoch auf chemischem Weg nicht oder nur sehr aufwendig darstellbar und stehen daher auch nicht in größeren Mengen zur Verfügung.

Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, das die wirtschaftliche Herstellung enantiomerenreiner Alkohole der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib und IIIa bzw. IIIb in hoher Ausbeute und hoher Enantiomerenreinheit ermöglicht.



wobei R_7 , R_8 und R_9 eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe repräsentieren, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird.

Unter dem Begriff „NADH“ wird reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid und unter dem Begriff „NAD“ Nicotinamid-adenin-dinucleotid verstanden. Unter dem Begriff „NADPH“ wird reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat und unter dem Begriff „NADP“ Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat verstanden.

Eine bevorzugte Ausführungsform dieses Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass $R_7=R_8=R_9=CH_3$.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass $R_7=CH_3$ und $R_8=R_9=C_2H_5$.

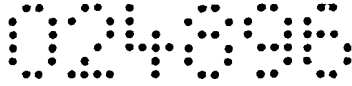
Die erfindungsgemäß als Ausgangsmaterial dienenden Ketone der allgemeinen Formel II bzw. IV sind im Allgemeinen leicht und preiswert erhältlich.

Die für die enzymatische Reduktion eingesetzte Dehydrogenase wird nach einer bevorzugten Ausführungsform aus mikrobiellem Ausgangsmaterial gewonnen. Welche Konfiguration der Produkte überwiegend oder ausschließlich gebildet wird, hängt von der Art der Dehydrogenase/Oxidoreduktase wie auch von der Art des Cofaktors ab.

Vorzugsweise wird bei den Verfahren zur Herstellung von enantiomerenreinen Alkoholen der allgemeinen Formeln Ia bzw. Ib und IIIa bzw. IIIb als R-spezifische Dehydrogenase eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus Lactobazillen der Gattung Lactobacilliales, insbesondere Lactobacillus kefir, Lactobacillus brevis oder Lactobacillus minor, oder aus Pseudomonas eingesetzt.

Unter R-spezifischen sekundären Alkoholdehydrogenasen werden dabei solche verstanden, die die Ketogruppe in einer Gruppierung $H_3C-C(C=O)-CH_2-C$ zu dem entsprechenden (R)-konfigurierten Alkohol reduzieren. Derartige R-spezifische sekundäre Alkoholdehydrogenasen sind z.B. in der US 5,200,335, der DE 196 10 984 A1, der DE 101 19 274 oder der US 5,385,833 beschrieben.

Als S-spezifische Dehydrogenase wird bevorzugt eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus der Gattung Pichia oder Candida, insbesondere Candida boidinii ADH, Candida parapsilosis



oder *Pichia capsulata*, eingesetzt. Derartige S-spezifische Dehydrogenasen sind z.B. in der US 5,523,223 oder der DE 103 27 454 beschrieben.

Das Enzym muss nicht in reiner Form eingesetzt werden. Ebenso gut können auch enzymhaltige Mikroorganismen oder mehr oder weniger gereinigte Lysate davon verwendet werden. Soll die Reaktion kontinuierlich durchgeführt werden, so können auch immobilisierte Enzyme verwendet werden. Die Immobilisierung kann beispielsweise durch Einschließen der Enzyme – insbesondere in polymere Netzwerke oder in semipermeable Membranen- oder durch Binden an einen Träger, beispielsweise durch Adsorption oder durch ionische oder kovalente Bindungen, erfolgen. Bevorzugt werden die Dehydrogenasen aber in freier Form eingesetzt.

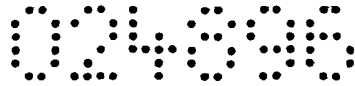
Die enzymatische Reduktion selbst läuft unter milden Bedingungen ab, so dass die erzeugten Alkohole nicht weiterreagieren. Die erfindungsgemäßen Verfahren weisen eine hohe Standzeit, eine Enantiomerenreinheit von mehr als 95 % der hergestellten chiralen Alkohole der Formeln Ia bzw. Ib und IIIa bzw. IIIb und eine hohe Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge an Ketoverbindungen der Formel II bzw. IV auf.

Die Oxidoreduktasen können in den erfindungsgemäßen Verfahren entweder vollständig gereinigt oder teilweise gereinigt, in Form von Zelllysaten oder in Form ganzer Zellen eingesetzt werden. Die eingesetzten Zellen können dabei nativ oder permeabilisiert vorliegen. Bevorzugt werden klonierte und überexprimierte Oxidoreduktasen (beispielsweise bekannt aus der US 5,523,223, der DE 103 27 454 oder der DE 101 19 274) eingesetzt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Verfahren beträgt die Volumenaktivität der eingesetzten Oxidoreduktase 10 U/ml bis 5000 U/ml, vorzugsweise 100 U/ml bis 1000 U/ml.

Je kg zu reduzierendem Keton werden im Verfahren 5000 bis 10.000.000 U, vorzugsweise 10.000 bis 1.000.000 U, Oxidoreduktase eingesetzt. Der Enzymeinheit 1 U entspricht dabei der Enzymmenge, die benötigt wird um 1 μ mol der Ketoverbindung der Formel II bzw. IV pro Minute umzusetzen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist weiters dadurch gekennzeichnet, dass das bei der Reduktion gebildete NAD oder NADP kontinuierlich mit einem Cosubstrat zu NADH bzw. NADPH reduziert wird.



Als Cosubstrat werden dabei bevorzugt primäre und sekundäre Alkohole, wie Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol, eingesetzt.

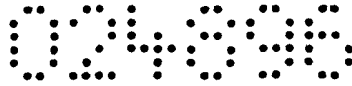
Diese Cosubstrate werden mit Hilfe einer Oxidoreduktase und NAD bzw. NADP zu den entsprechenden Aldehyden oder Ketonen und NADH bzw. NADPH umgesetzt. Dadurch kommt es zur Regenerierung des NADH bzw. NADPH. Der Anteil des Cosubstrates für die Regenerierung beträgt dabei von 5 bis 95 Vol %, bezogen auf das Gesamtvolumen.

Zur Regenerierung des Cofactors kann zusätzlich eine Alkoholdehydrogenase zugesetzt werden. Geeignete NADH-abhängige Alkoholdehydrogenasen sind beispielsweise erhältlich aus Bäckerhefe, aus *Candida boidinii*, *Candida parapsilosis* oder *Pichia capsulata*. Geeignete NADPH-abhängige Alkoholdehydrogenasen kommen ferner vor in *Lactobacillus brevis* (DE 196 10 984 A1), *Lactobacillus minor* (DE 101 19 274), *Pseudomonas* (US 5,385,833) oder in *Thermoanaerobium brockii*. Geeignete Cosubstrate für diese Alkoholdehydrogenasen sind die bereits genannten sekundären Alkohole wie Ethanol, 2-Propanol (Isopropanol), 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol.

Ferner kann die Cofactorregenerierung beispielsweise auch mit mittels NAD- oder NADP-abhängiger Formiat-Dehydrogenase (Tishkov et al., *J. Biotechnol. Bioeng.* [1999] 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific Formate dehydrogenase) durchgeführt werden. Geeignete Cosubstrate der Formiat-Dehydrogenase sind beispielsweise Salze der Ameisensäure wie Ammoniumformiat, Natriumformiat oder Calciumformiat. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Verfahren jedoch ohne eine solche zusätzliche Dehydrogenase durchgeführt, d.h. es findet eine substratgekoppelte Coenzymregenerierung statt.

Der wässrige Anteil des Reaktionsgemisches, in dem die enzymatische Reduktion abläuft enthält bevorzugt einen Puffer, beispielsweise Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer, mit einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise ein pH-Wert von 6 bis 9. Der Puffer kann zusätzlich noch Ionen zur Stabilisierung oder Aktivierung der Enzyme enthalten, beispielsweise Zinkionen oder Magnesiumionen.

Die Temperatur beträgt während der Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren zweckmäßig von etwa 10°C bis 70°C, bevorzugt von 20°C bis 40°C.



In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren wird die enzymatische Umsetzung in Anwesenheit eines mit Wasser nicht oder nur beschränkt mischbaren organischen Lösungsmittels durchgeführt. Dieses Lösungsmittel ist beispielsweise ein symmetrischer oder unsymmetrischer Di(C₁-C₆)alkylether, ein geradkettiges oder verzweigtes Alkan oder Cycloalkan oder ein wasserunlöslicher sekundärer Alkohol, der zugleich das Cosubstrat darstellt. Die bevorzugten organischen Lösungsmittel sind beispielsweise Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether, Dibutylether, Butylacetat, Heptan, Hexan, 2-Oktanol, 2-Heptanol, 4-Methyl-2-pentanol oder Cyclohexan.

Der Reaktionsansatz besteht beim Einsatz wasserunlöslicher Lösungsmittel bzw. Cosubstrate aus einer wässrigen und einer organischen Phase. Das Substrat verteilt sich entsprechend seiner Löslichkeit zwischen organischer und wässriger Phase. Die organische Phase hat allgemein einen Anteil von 5 bis 95 %, bevorzugt von 20 bis 90 % bezogen auf das gesamte Reaktionsvolumen. Die zwei flüssigen Phasen werden bevorzugt mechanisch gemischt, so dass eine große Oberfläche zwischen ihnen erzeugt wird. Auch in dieser Ausführungsform kann das bei der enzymatischen Reduktion gebildete NAD bzw. NADP mit einem Cosubstrat, wie beschrieben, wieder zu NADH bzw. NADPH reduziert werden.

Die Konzentration des Cofaktors NADH bzw. NADPH in der wässrigen Phase beträgt allgemein 0,001 mM bis 1mM, insbesondere 0,01 mM bis 0,1 mM.

In den erfindungsgemäßen Verfahren kann noch ein Stabilisator der Oxidoreduktase/Dehydrogenase eingesetzt werden. Geeignete Stabilisatoren sind beispielsweise Glycerin, Sorbitol, 1,4 -DL-Dithiothreit (DTT) oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise in einem geschlossenen Reaktionsgefäß aus Glas oder Metall durchgeführt. Dazu werden die Komponenten einzeln in das Reaktionsgefäß überführt und unter einer Atmosphäre von beispielsweise Stickstoff oder Luft gerührt. Die Reaktionszeit beträgt von 1 Stunde bis 48 Stunden, insbesondere von 2 Stunden bis 24 Stunden.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Dazu wird die wässrige Phase abgetrennt, die organische Phase wird filtriert. Die wässrige Phase kann gegebenenfalls noch einmal extrahiert werden und wie die organische Phase weiter aufgearbeitet werden. Danach wird gegebenenfalls das Lösungsmittel aus der filtrierten organischen Phase verdampft.



Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiele:

Analytik:

a) Amide:

Die Bestimmung des ee (enantiomeric excess) erfolgte mittels chiraler Gaschromatographie. Dazu wurde ein Gaschromatograph GC-17A von Shimadzu mit einer chiralen Trennsäule CP-Chirasil-DEX CB (Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland), Flammen-Ionisations-Detektor und Helium als Trägergas benutzt.

Die Trennung von N,N-Dimethyl-3-hydroxybutanamid erfolgte bei 0,86 bar und 10 min bei 120°C, 2°C/min → 125°C.

Die Retentionszeiten waren: (3R) 10,42 min und (3S) 10,09 min.

Die Trennung von N,N-Diethyl-3-hydroxybutanamid erfolgte bei 0,75 bar und 10 min bei 130°C, 2°C/min → 135°C.

Die Retentionszeiten waren: (3R) 11,6 min und (3S) 11,3 min.

b) Chlor-Verbindungen:

Die Bestimmung des ee (enantiomeric excess) erfolgte mittels chiraler Gaschromatographie. Dazu wurde ein Gaschromatograph GC-17A von Shimadzu mit einer chiralen Trennsäule FS-Hydrodex β-6-TBDM (Machery-Nagel, Düren, Deutschland), Flammen-Ionisations-Detektor und Helium als Trägergas benutzt.

Die Trennung von 1-Chloropropan-2-ol erfolgte bei 0,94 bar und 15 min bei 40°C, 1°C/min → 50°C.

Die Retentionszeiten waren: (2R) 20,3 min und (2S) 20,9 min.

Die Trennung von 1,1-Dichloropropan-2-ol erfolgte bei 0,69 bar und 15 min bei 80°C, 2°C/min → 95°C.

Die Retentionszeiten waren: (2R) 20,8 min und (2S) 21,4 min.

Die Trennung von 1,1,3-Trichloropropan-2-ol erfolgte bei 0,69 bar und 30 min bei 120°C isotherm.

Die Retentionszeiten waren: (2R) 25,0 min und (2S) 24,5 min.

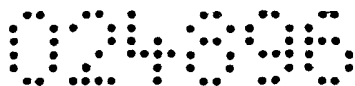
Die Trennung von 3-Chlorobutan-2-ol erfolgte bei 0,98 bar und 25 min bei 50°C isotherm.

Die Retentionszeiten waren:

(3R)-3-Chlorobutan-2-ol: 6,0 min

(3S)-3-Chlorobutan-2-ol: 6,2 min

(3R,2R)-3-Chlorobutan-2-ol: 17,5 min



8

(3R,2S)-3-Chlorobutan-2-ol: 18,1 min

(3S,2R)-3-Chlorobutan-2-ol: 20,7 min

(3S,2S)-3-Chlorobutan-2-ol: 22,1 min

1. **Synthese von (S)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid aus N,N-Diethylacetoacetamid**

Zur Synthese von (R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid wurde ein Gemisch aus 172 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 0,5 mM DTT, 20% Glycerin), 18 ml 2-Propanol (0,23 mol), 10 ml N,N-Diethylacetoacetamid (63 mmol), 200 mg NAD und 30000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Candida parapsilosis* für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 97 % des eingesetzten N,N-Diethylacetoacetamid zu (S)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten 2,5 g (S)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid mit einer Reinheit >98% und einem Enantiomerenüberschuss von >99,9% gewonnen werden.

Analysenergebnisse:

Elementaranalyse % gef.(ber): C₈H₁₇NO₂

C: 59,8 (60,4)

H: 10,7 (10,8)

N: 8,9 (8,8)

¹H-NMR in CDCl₃:

Signal	Integral	Zuordnung
1,13 (T) + 1,19 ppm (T)	6	2x CH ₃ (Ethyl)
1,22 ppm	3	CH ₃ (neben chiralem Zentrum)
2,3 (DvD)+ 2,5 (DvD)	2	CH ₂ (neben chiralem Zentrum)
3,2 (DvD)+ 3,5 (DvD)	4,2	2 x CH ₂
4,2(M)	1	CH (chirales Zentrum)
4,7(S)	0,9	OH



9

^{13}C -NMR in CDCl_3 :

Signal	Zuordnung
12 ppm	CH_3 (Ethyl)
14 ppm	CH_3 (Ethyl)
22 ppm	CH_3 (neben chiralem Zentrum)
39 ppm	CH_2
40 ppm	CH_2
41 ppm	CH_2
64 ppm	CH (chirales Zentrum)
171 ppm	$\text{C}=\text{O}$
(78 ppm)	Lösungsmittel (CDCl_3)

Spezifische Drehwerte:

Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ der Enantiomere wurde mit einem Präzisionspolarimeter POL-S2 bei einer Schichtdicke von 1 dm gemessen. Für die Untersuchung wurden 0,5 g Probe in 25 ml EtOH gelöst.

(S)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid (100%) $[\alpha]_D^{20} = +19,92 \pm 1^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

2. Synthese von (R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid aus N,N-Diethylacetoacetamid

Zur Synthese von (R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid wurde ein Gemisch aus 290 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM MgCl_2 , 10% Glycerin), 100 ml 2-Propanol (1,3 mol), 10 ml N,N-Diethylacetoacetamid (63 mmol), 20 mg NADP und 60000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus minor* (DE-A 101 19 274) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 60 % des eingesetzten N,N-Diethylacetoacetamid zu (R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten 2,5 g (R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid mit einer Reinheit >98% und einem Enantiomerenüberschuss von >99% gewonnen werden.

Analysenergebnisse:

Elementaranalyse % gef.(ber): $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_2$

C: 59,8 (60,4)



10

H: 10,7 (10,8)

N: 8,9 (8,8)

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 : Ergebnisse analog zu Beispiel 1

$^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 : Ergebnisse analog zu Beispiel 1

Spezifische Drehwerte:

(R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid (100%) $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19,7 \pm 1 \text{ }^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

Mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und Elementaranalyse konnte die Struktur der Alkohole (S)- und (R)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid bestätigt werden. Die genaue Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte mittels chiraler GC und über Bestimmung des Drehwertes $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$.

3. **Synthese von (R)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid aus N,N-Dimethylacetoacetamid**

Zur Synthese von (R)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid wurde ein Gemisch aus 525 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM MgCl_2 , 10% Glycerin), 90 ml 2-Propanol (1,18 mol), 15 ml N,N-Dimethylacetoacetamid (120 mmol), 30 mg NADP und 50000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus minor* (DE-A 101 19 274) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 95 % des eingesetzten N,N-Dimethylacetoacetamid zu (R)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten 0,23 g (R)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid mit einer Reinheit >98% und einem Enantiomerenüberschuss von >99,0% gewonnen werden.

Analysenergebnisse:

Elementaranalyse % gef.(ber): $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$

C: 54,2 (54,9)

H: 9,7 (10,0)

N: 10,4 (10,7)



$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

Signal	Integral	Zuordnung
1,2 ppm (D)	3	CH_3 (neben chiralem Zentrum)
2,3 (DvD)+ 2,5 (DvD)ppm	2	CH_2 (neben chiralem Zentrum)
2,9 (S)+ 3,0 (S)ppm	6	2 x CH_3
4,2 ppm (M)	1	CH (chirales Zentrum)
4,6 ppm(S)	1,0	OH

$^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 :

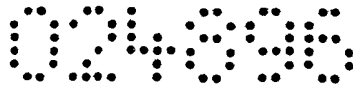
Signal	Zuordnung
22ppm	CH_3 (neben chiralem Zentrum)
34 ppm	CH_3
36 ppm	CH_3
41 ppm	CH_2
64 ppm	CH (chirales Zentrum)
171 ppm	C=O
(78 ppm)	Lösungsmittel (CDCl_3)

Spezifische Drehwerte:

(R)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid (100%) $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -29,1 \pm 1 \text{ } ^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

4. Synthese von (S)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid aus N,N-Dimethylacetoacetamid

Zur Synthese von (S)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid wurde ein Gemisch aus 89 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM ZnCl_2 , 10% Glycerin), 9 ml 2-Propanol (0,12 mol), 2,5 ml N,N-Dimethylacetoacetamid (19 mmol), 10 mg NAD und 16000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Candida parapsilosis* für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 95 % des eingesetzten N,N-Dimethylacetoacetamid zu (S)-3-Hydroxy-N,N-diethylbutanamid reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten so (S)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid mit einer Reinheit >98% und einem Enantiomerenüberschuss von >99,0% gewonnen werden.



Spezifische Drehwerte:

(S)-3-Hydroxy-N,N-dimethylbutanamid (100%) $[\alpha]_D^{20} = + 29,1 \pm 1 \text{ } ^\circ \times \text{ l/g}\cdot\text{dm}$

5. Synthese von (S)-1,1-Dichlor-2-propanol aus 1,1-Dichloraceton

Zur Synthese von (S)-1,1-Dichlor-2-propanol wurde ein Gemisch aus 640 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM ZnCl₂, 20% Glycerin), 80 ml 2-Propanol (1,05 mol), 20 ml 1,1-Dichloraceton (0,2 mol), 40 mg NAD und 13000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Pichia capsulata* (DE-A 103 27 454) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 100 % des eingesetzten 1,1-Dichloraceton zu (S)-1,1-Dichlor-2-propanol reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten 6,5 g (S)-1,1-Dichlor-2-propanol mit einer Reinheit >99% und einem Enantiomerentüberschuss von >99,9% gewonnen werden.

Analysenergebnisse:

Elementaranalyse und Chlorbestimmung % gef.(ber): C₃H₆Cl₂O

C: 26,7 (27,9)

H: 4,7 (4,7)

O: 14,8 (12,4)

Cl: 53,4 (55)

¹H-NMR in CDCl₃:

Signal	Integral	Zuordnung
1,3 ppm (D)	3,1	CH ₃
3,2 ppm (D)	1	OH
4,1 ppm (DvQ)	1	CH (chirales Zentrum)
5,7 ppm(S)	1,0	CH

¹³C-NMR in CDCl₃:

Signal	Zuordnung
18 ppm	CH ₃
72 ppm	CH



77 ppm	CH
--------	----

Spezifische Drehwerte:

(S)-1,1-Dichlor-2-propanol (100%) $[\alpha]_D^{20} = -19,1 \pm 1 \text{ }^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

6. **Synthese von (R)-1,1-Dichlor-2-propanol aus 1,1-Dichloraceton**

Zur Synthese von (R)-1,1-Dichlor-2-propanol wurde ein Gemisch aus 320 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerin), 60 ml 2-Propanol (0,78 mol), 20 ml 1,1-Dichloraceton (0,2 mol) gelöst in 40 ml Ethylacetat, 40 mg NADP und 8000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus minor* (DE-A 101 19 274) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 100 % des eingesetzten 1,1-Dichloraceton zu (R)-1,1-Dichlor-2-propanol reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten 4,8 g (R)-1,1-Dichlor-2-propanol mit einer Reinheit >98% und einem Enantiomerenüberschuss von >95% gewonnen werden.

Analysenergebnisse:

Elementaranalyse und Chlorbestimmung % gef.(ber): C₃H₆Cl₂O

C: 26,7 (27,9)

H: 4,7 (4,7)

O: 14,8 (12,4)

Cl: 53,4 (55)

¹H-NMR in CDCl₃: analog Beispiel 5

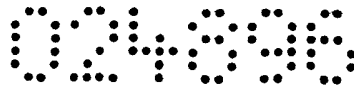
¹³C-NMR in CDCl₃: analog Beispiel 5

Spezifische Drehwerte:

(R)-1,1-Dichlor-2-propanol (100%) $[\alpha]_D^{20} = +19,56 \pm 1 \text{ }^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

7. **Synthese von (R)-1,1,3-Trichlor-2-propanol aus 1,1,3-Trichloraceton**

Zur Synthese von (R)-1,1,3-Trichlor-2-propanol wurde ein Gemisch aus 110 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerin), 40 ml 2-Propanol (0,52 mol), 10



14

ml 1,1,3-Trichloraceton (93 mmol) gelöst in 40 ml Ethylacetat, 20 mg NADP und 12000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus minor* (DE-A 101 19 274) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 100 % des eingesetzten 1,1,3-Trichloraceton zu (R)-1,1,3-Trichlor-2-propanol reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Vakuumdestillation aufgereinigt. Es konnten 8,9 g (R)-1,1,3-Trichlor-2-propanol mit einer Reinheit >99% und einem Enantiomerenüberschuss von >97% gewonnen werden.

Analysenergebnisse:

Elementaranalyse und Chlorbestimmung % gef.(ber): C₃H₅Cl₃O

C: 22,1 (22,1)

H: 2,8 (3,1)

O: 11,1 (9,8)

Cl: 63,9 (65,1)

¹H-NMR in CDCl₃:

Signal	Integral	Zuordnung
3,3 ppm (S)	1	OH
3,8 ppm (D)	2	CH ₂
4,2 ppm (M)	1	CH (chirales Zentrum)
5,9 ppm(D)	1,0	CH

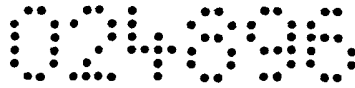
¹³C-NMR in CDCl₃:

Signal	Zuordnung
45 ppm	CH ₂
73 ppm	CH
77 ppm	CH

Spezifische Drehwerte:

(R)-1,1,3-Trichlor-2-propanol (100%) $[\alpha]_D^{20} = + 10,1 \pm 1 \text{ } ^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

8. Synthese von (S)-1,1,3-Trichlor-2-propanol aus 1,1,3-Trichloraceton



Zur Synthese von (S)- 1,1,3-Trichlor-2-propanol wurde ein Gemisch aus 9 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 1 mM ZnCl₂, 20% Glycerin), 0,8 ml 2-Propanol (10 mmol), 0,25 ml 1,1,3-Trichloraceton (0,2 mol), 10 mg NAD und 2000 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Pichia capsulata* (DE-A 103 27 454) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 97 % des eingesetzten 1,1,3-Trichloraceton zu (S)-1,1,3-Trichlor-2-propanol mit einem Enantiomerenüberschuss von >60% reduziert.

Spezifische Drehwerte:

(S)-1,1,3-Trichlor-2-propanol (100%) $[\alpha]_D^{20} = - 10,1 \pm 1 \text{ }^\circ \times \text{l/g}\cdot\text{dm}$

9. **Synthese von S-Chlor-2-propanol aus Chloraceton**

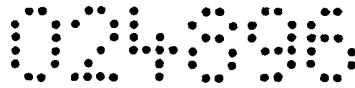
Zur Synthese von S-Chlor-2-propanol wurde ein Gemisch aus 0,6 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 10% Glycerin, 1 mM ZnCl₂), 400 µl 4-Methyl-2-propanol, 100 µl Chloraceton, 1mg NAD und 60 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Pichia capsulata* (DE-A 103 27 454) bzw. *Candida parapsilosis* für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 100% des eingesetzten Chloraceton zu S-Chlor-2-propanol mit einem Enantiomerenüberschuss von >97% reduziert.

10. **Synthese von R-Chlor-2-propanol aus Chloraceton**

Zur Synthese von R-Chlor-2-propanol wurde ein Gemisch aus 0,4 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 10% Glycerin), 300 µl 2-Propanol, 100 µl Chloraceton gelöst in 200 µl Ethylacetat, 1 mg NADP und 30 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus minor* (DE-A 101 19 274) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 100% des eingesetzten Chloraceton zu R-Chlor-2-propanol mit einem Enantiomerenüberschuss von >95% reduziert.

11. **Synthese von (2S)-3-chlor-2-butanol aus 3-Chlor-2-butanon**

Zur Synthese von (2S)-3-chlor-2-butanol wurde ein Gemisch aus 0,45 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 10% Glycerin, 1 mM ZnCl₂), 450 µl 4-Methyl-2-propanol, 100 µl 3-Chlor-2-butanon (1 mmol), 0,1mg NAD (0,15 µmol) und 60 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Pichia capsulata* (DE-A 103 27 454) bzw. *Candida parapsilosis* für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren



16

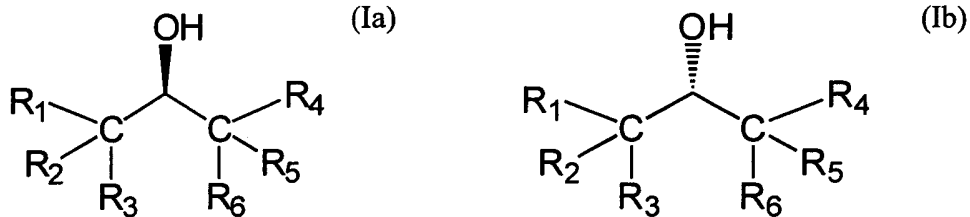
100% des eingesetzten 3-Chlor-2-butanon zu (2S)-3-chlor-2-butanol mit einem Enantiomerenüberschuss von >98% reduziert.

12. **Synthese von (2R)-3-chlor-2-butanol aus 3-Chlor-2-butanon**

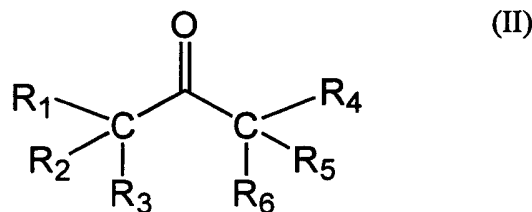
Zur Synthese von (2R)-3-chlor-2-butanol wurde ein Gemisch aus 0,45 ml Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 10% Glycerin, 1 mM MgCl₂), 450 µl 4-Methyl-2-propanol, 100 µl 3-Chlor-2-butanon (1 mmol), 0,1mg NADP (0,13 µmol) und 60 Units rekombinante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus minor* (DE-A 101 19 274) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 100% des eingesetzten 3-Chlor-2-butanon zu (2R)-3-chlor-2-butanol mit einem Enantiomerenüberschuss von >98% reduziert.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines enantiomerenreinen Alkohols der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib



wobei R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 jeweils Wasserstoff, Halogen, eine C_1 - C_6 -Alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkoxygruppe repräsentieren, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 von den übrigen fünf verschieden ist, sowie der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 ein Halogen ist, dadurch gekennzeichnet, dass ein Keton der allgemeinen Formel II

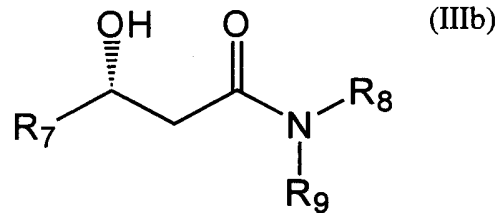
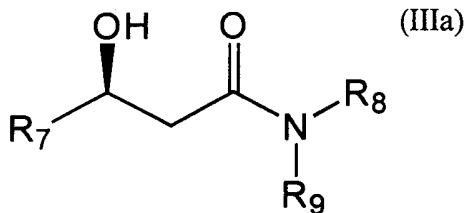


wobei R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_6 die oben angegebene Bedeutung besitzen, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird.

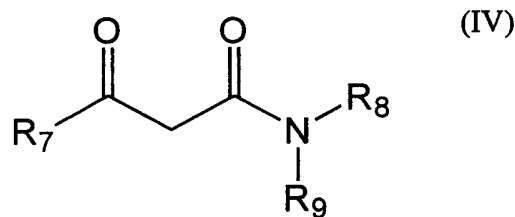
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1=R_2=Cl$ und $R_3=R_4=R_5=R_6=H$.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1=R_2=R_4=Cl$ und $R_3=R_5=R_6=H$.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1=CH_3$, $R_2=Cl$ und $R_3=R_4=R_5=R_6=H$.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1 = \text{Cl}$ und $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$.

6. Verfahren zur Herstellung eines enantiomerenreinen Alkohols der allgemeinen Formel IIIa bzw. IIIb



wobei R_7 , R_8 und R_9 eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe repräsentieren, dadurch gekennzeichnet, dass ein Keton der allgemeinen Formel IV



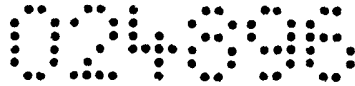
wobei R_7 , R_8 und R_9 die oben angegebene Bedeutung besitzen, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass $R_7 = R_8 = R_9 = \text{CH}_3$.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass $R_7 = \text{CH}_3$ und $R_8 = R_9 = \text{C}_2\text{H}_5$.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als R-spezifische Dehydrogenase eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus Lactobazillen der Gattung Lactobacilliales, insbesondere Lactobacillus kefir, Lactobacillus brevis oder Lactobacillus minor, oder aus Pseudomonas eingesetzt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als S-spezifische Dehydrogenase eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus der Gattung Pichia



oder Candida, insbesondere Candida boidinii ADH, Candida parapsilosis oder Pichia capsulata, eingesetzt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Volumenaktivität der eingesetzten Oxidoreduktase 10 U/ml bis 5000 U/ml, vorzugsweise 100 U/ml bis 1000 U/ml, beträgt.

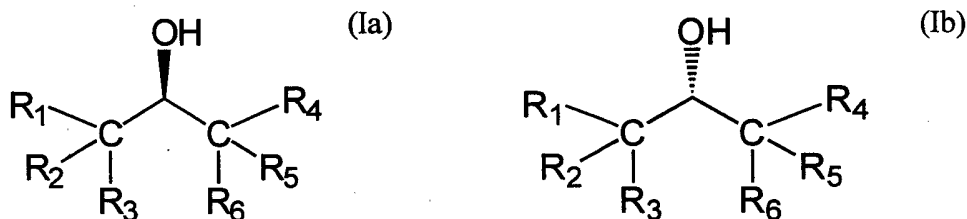
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass je kg zu reduzierendem Keton 5000 bis 10.000.000 U, vorzugsweise 10.000 bis 1.000.000 U, Oxidoreduktase eingesetzt werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das bei der Reduktion gebildete NAD oder NADP kontinuierlich mit einem Cosubstrat zu NADH bzw. NADPH reduziert wird.

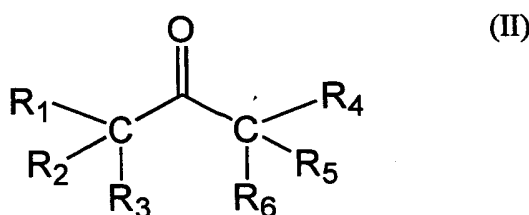
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Cosubstrat primäre und sekundäre Alkohole, wie Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol, eingesetzt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Alkohols der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib mit einer Enantiomerenreinheit (ee) von >95%,



wobei R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 jeweils Wasserstoff, Halogen, eine C_1 - C_6 -Alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkoxygruppe repräsentieren, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 von den übrigen fünf verschieden ist, sowie der Maßgabe, dass mindestens einer der Reste R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 ein Halogen ist, dadurch gekennzeichnet, dass ein Keton der allgemeinen Formel II

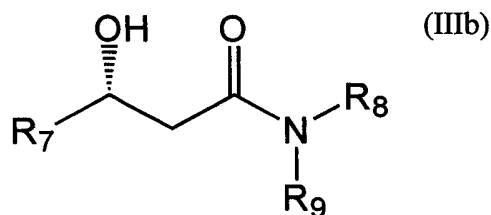
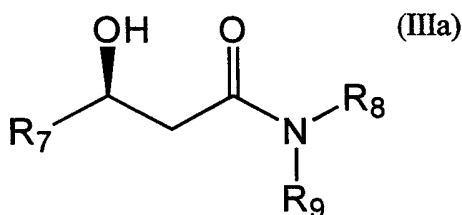


wobei R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 und R_6 die oben angegebene Bedeutung besitzen, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird und das bei der Reduktion gebildete NAD oder NADP kontinuierlich mit einem Cosubstrat zu NADH bzw. NADPH reduziert wird.

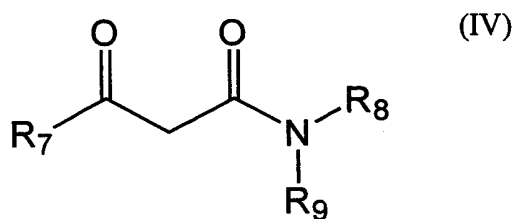
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1=R_2=Cl$ und $R_3=R_4=R_5=R_6=H$.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1=R_2=R_4=Cl$ und $R_3=R_5=R_6=H$.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1=CH_3, R_2=Cl$ und $R_3=R_4=R_5=R_6=H$.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $R_1 = \text{Cl}$ und $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$.

6. Verfahren zur Herstellung eines enantiomerenreinen Alkohols der allgemeinen Formel IIIa bzw. IIIb



wobei R_7 , R_8 und R_9 eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe repräsentieren, dadurch gekennzeichnet, dass ein Keton der allgemeinen Formel IV

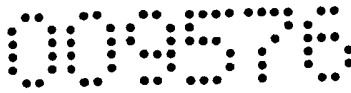


wobei R_7 , R_8 und R_9 die oben angegebene Bedeutung besitzen, in Gegenwart einer S- bzw. R-spezifischen Dehydrogenase/Oxidoreduktase unter Verwendung von NADH oder NADPH als Cofaktor enzymatisch reduziert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass $R_7 = R_8 = R_9 = \text{CH}_3$.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass $R_7 = \text{CH}_3$ und $R_8 = R_9 = \text{C}_2\text{H}_5$.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als R-spezifische Dehydrogenase eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus Lactobazillen der Gattung Lactobacilliales, insbesondere Lactobacillus kefir, Lactobacillus brevis oder Lactobacillus minor, oder aus Pseudomonas eingesetzt wird.



10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als S-spezifische Dehydrogenase eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus der Gattung *Pichia* oder *Candida*, insbesondere *Candida boidinii* ADH, *Candida parapsilosis* oder *Pichia capsulata*, eingesetzt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Volumenaktivität der eingesetzten Oxidoreduktase 10 U/ml bis 5000 U/ml, vorzugsweise 100 U/ml bis 1000 U/ml, beträgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass je kg zu reduzierendem Keton 5000 bis 10.000.000 U, vorzugsweise 10.000 bis 1.000.000 U, Oxidoreduktase eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das bei der Reduktion gebildete NAD oder NADP kontinuierlich mit einem Cosubstrat zu NADH bzw. NADPH reduziert wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Cosubstrat primäre und sekundäre Alkohole, wie Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol, eingesetzt werden.



Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC ⁸ : C07C29/143; C07C231/12; C12P7/04; C12P13/02; C07C		
Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß ECLA:		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): C07C, C12P		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, EPODOC, PAJ, REGISTRY, CAPLUS, CASREACT		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 27. Oktober 2004 eingereichten Ansprüchen 1-14 erstellt.		
Kategorie ⁷⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
E	WO2004111083 A2 (JUELICH ENZYME PROD GMBH) 23. Dezember 2004 (23.12.2004) ; in der Anmeldung zitiert (&DE10327454 A1) <i>Ansprüche 23-25, 30, 31, 35, 36; Seite 13, Zeilen 5-29</i>	1-5, 10-14
	--	
X	DE10119274 A1 (JUELICH ENZYME PROD GMBH) 31. Oktober 2002 (31.10.2002) ; in der Anmeldung zitiert <i>Zusammenfassung; Ansprüche 1, 6, 11, 18; Absatz [0043]</i>	1-5, 9, 11-14
	--	
X	US5385833 A (BRADSHAW C W et al.) 31. Jänner 1995 (31.01.1995) ; in der Anmeldung zitiert <i>Zusammenfassung, Ansprüche 1,3,4</i>	1-9, 13, 14
	--	
X	Groger, Harald et al. " Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase " Tetrahedron (2004), 60(3), 633-640. <i>Zusammenfassung, Tabelle 3, Entry 4</i>	1,5,10
	--	
Datum der Beendigung der Recherche: 23. Dezember 2005		<input checked="" type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. MULLER-HIEL
⁷⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	Nakamura, Kaoru " Highly stereoselective reduction of ketones by Geotrichum candidum " Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (1998), 5(1-4), 129-132 (abstract). CASREACT [online] Copyright 2005 ACS on STN [retrieved on 23. Dezember 2005 (23.12.2005)]. Retrieved from: STN International, Karlsruhe. Accession No. 129:259363 CASREACT. <i>Zusammenfassung, Reaktionen RX (13-16) of 16</i>	1, 13, 14
X	-- Ema, Tadashi et al. " Highly Enantioselective Reduction of Carbonyl Compounds Using a Reductase Purified from Bakers' Yeast " Journal of Organic Chemistry (1998), 63(15), 4996-5000 (abstract). CASREACT [online] Copyright 2005 ACS on STN [retrieved on 23. Dezember 2005 (23.12.2005)]. Retrieved from: STN International, Karlsruhe. Accession No. 129:161326 CASREACT. <i>Zusammenfassung, RX (1) of 7</i>	1
X	-- Besse, Pascale et al. " Chemoenzymic synthesis of α -halo-3-octanol and 4- or 5-nonanols. Application to the preparation of chiral epoxides " Tetrahedron: Asymmetry (1998), 9(24), 4441-4457. <i>Zusammenfassung, Beispiele 4.3.</i> ----	1,9