

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 95124516

※ 申請日期： 95.7.5

※IPC 分類：C12P 7/64(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

1,1,1-三氟丙酮之不對稱還原

ASYMMETRIC REDUCTION OF 1,1,1-TRIFLUOROACETONE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

菲杜林 克勞士納

KLAUSNER, FRIDOLIN

丹尼斯 史崔柏

STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號

124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 史蒂芬 多斯沃
DOSWALD, STEPHAN
2. 史蒂芬 保羅 漢隆
HANLON, STEVEN PAUL
3. 恩斯特 庫佛
KUPFER, ERNST

國 籍：(中文/英文)

1. 瑞士 SWITZERLAND
2. 英國 U.K.
3. 瑞士 SWITZERLAND

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2005年07月08日；05106261.0

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

提供高鏡像異構性純度之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇(旋光度: -5.65°)，但該方法不適合用於大規模生產。

T.C. Rosen等人(2004), *Chimica Oggi Suppl.*, 43-45，藉由使用天然宿主中或作為在大腸桿菌(*E. coli*)中表現之重組酶之乙醇脫氫酶(ADH)進行1,1,1-三氟丙酮之不對稱還原來製備(R)-及(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。可使用休眠完整細胞或粗無細胞萃取物，且在後者情況下必需添加輔因子再生系統。所得(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇可在 Jülich Fine Chemicals購得，但所提供之物質不具備吾等所需之足夠鏡像異構性純度($> 92.5\%$ ee)。

M. Buccierelli等人(1983), *Synthesis* 11, 897-899，描述在實驗室規模上藉由使用(休眠)焙用酵母進行1,1,1-三氟丙酮之不對稱還原來製備(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。儘管該反應可快速進行(4小時)，但需要相對於基質300倍過量之酵母，該基質濃度僅為2.5 g/kg酵母懸浮液，且僅獲得約80% ee之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇(如根據經分離乙醇之 -4.5° 旋光度與純乙醇之 -5.6° 旋光度進行比較所計算)，該值遠低於吾等所需值。此外，基於重複溶劑萃取與蒸餾相組合之分離方案在經濟上不適於大規模應用。

在文獻中使用若干優化微生物還原之立體選擇性之方法，例如微生物細胞之丙酮處理或在有機溶劑中執行生物轉化。該兩種方法之缺點在於使用溶劑使方法更昂貴，且更重要在於所用溶劑使得用於分離沸點為 $76-77^\circ\text{C}$ 之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之已經高要求之程序變得更加複雜。

另一種增加立體異構性之方法為使用抑制劑以阻斷提供不需要之異構體之酶。A.C. Dahl 等人(1999), *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 551-559, 報導以未經熱處理之焙用酵母及烯丙醇將乙基-3-氧代戊酸還原成乙基-3(R)-羥基-戊酸(100%產率及92-93% ee)。當經熱處理之焙用酵母(於48°C下歷時60 min)與烯丙醇組合使用, 以80-95%產率獲得產物且ee增加至98%。然而, 對於成功反應而言, 使用約1 g/L之基質濃度且需要分別相對於基質250倍之酵母、相對於基質4倍之抑制劑。

另一種影響微生物還原之立體選擇性之方法在於對微生物細胞進行熱處理, 以使提供不需要之立體異構體之酶失活。Y. Yasohara 等人(1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 847-851, 研究以各種酵母將4-氯-3-氧代丁酸乙酯(COBE)還原為4-氯-(S)-3-羥基丁酸乙酯(CHBE)。經丙酮處理之木蘭假絲酵母(*Candida magnolia*)細胞以75%莫耳產率將COBE轉化成具有91.0% ee之(S)-CHBE。當對該等木蘭假絲酵母細胞進行熱處理(60°C)時, 以75%產率獲得具有大於98% ee之(S)-CHBE。另一方面, 當使用經丙酮處理之釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞(未經熱處理)時, 以53%莫耳產率獲得(S)-CHBE且其僅具有14.8% ee。在於50°C下釀酒酵母細胞之熱處理後, 僅以10%產率獲得具有53.8% ee之(S)-CHBE。在於60°C之熱處理後, 獲得具有大於98% ee之(S)-CHBE。在製備規模上, 分別使用釀酒酵母細胞, 在60小時內, 將90 g/L之COBE定量地轉化成

具有96.6% ee之(S)-CHBE，而使用經熱處理細胞，產率為97%且具有大於99% ee。該反應在具有乙酸正丁酯之兩相系統中進行且需要一輔酶再生系統(葡萄糖、NAD(P)及葡萄糖脫氫酶)。由於藉由丙酮處理使內源性酶失活，因此需要基於葡萄糖脫氫酶之輔因子再生系統。

Z.H. Yang 等人(2004), *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 4871-4875，亦描述藉由酵母催化 COBE 不對稱還原成(S)-CHBE。藉由酵母(50°C)之熱處理，(S)-CHBE之ee自84%增加至97%，其預處理時間自30 min增加至120 min。另一方面，COBE之轉化率自96%下降至82%。葡萄糖係用於使NAD(P)再生成NAD(P)H。該反應係以來自經乾燥焙用酵母之酵母進行。所述程序對於大規模生產並不適用且不經濟。

K. Nakamura 等人(1996), *Tetrahedron: Asymmetry* 7, 409-412，描述將 α -二酮酵母還原成相應羥基酮化合物，其中熱處理影響該反應之區位選擇性。儘管(例如)以經熱處理之酵母將1-苯基-1,2-丙二酮還原成80%產率及大於98% ee之1-苯基-2-羥基-1-丙酮，但該反應需要相對大量之酵母(相對於基質為30倍)。

【發明內容】

本發明之目的在於提供一種產生具有高鏡像異構性純度(大於99% ee)之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之有效程序。

已發現特別廉價之商用焙用酵母之立體異構性可受所定義之熱處理影響，以使1,1,1-三氟丙酮幾乎定量地還原成

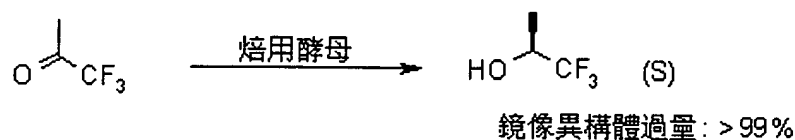
具有高 ee 之 (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。

不需酶抑制劑及輔酶再生系統即可達成所需大於 99% 之高鏡像異構性純度。幸運地，藉由該熱處理使生物催化劑失活得到足夠限制，以致仍可使用技術上相關之基質濃度且生物質量之量（其必須用於補償活性損失）仍可為有效處理所接受。在生物轉化期間，乙醇產量可保持在某一水平以容許有效處理。此外，僅基於蒸餾，發展一技術上有吸引力之產物回收方法。

【實施方式】

如下將對本發明作更詳細描述：

流程 1



本發明係關於一種藉由以焙用酵母進行 1,1,1-三氟丙酮之不對稱生物還原來製備具有大於 99% 之鏡像異構性純度之 (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇的可縮放生物催化方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將焙用酵母於 0.1-0.4 M 磷酸鉀緩衝液中之懸浮液經 60 min 之時間加熱至 50-52°C，
- b) 將該懸浮液於 50-52°C 下保持另外 90 min 之時間，
- c) 用緩衝液稀釋經加熱之懸浮液至酵母濃度為 20-30% w/v 且在 120 min 內冷卻至 10°C，
- d) 在該整個方法中，藉由自動添加 4 M KOH 溶液將 pH 值

保持恆定在 7.4 至 7.5，

e) 於低於 1,1,1-三氟丙酮之沸點之溫度下，添加 1,1,1-三氟丙酮至濃度為 1-5% (w/v) 以進行生物轉化，

f) 於 20°C 下在 5 至 8 天內，將 1,1,1-三氟丙酮還原為 (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，及

g) 藉由一系列蒸餾步驟分離該 (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。

在本文中所用 "焙用酵母" 係一種可大批量獲得之廉價標準商用焙用酵母，例如購自 Klipfel AG, Rheinfelden (Switzerland)。

較佳條件如下：

i) 該生物轉化係於室溫下進行 5-8 天之時間，

ii) 所用緩衝液為 0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7-8，

iii) 基質濃度為 2-4% w/v，

iv) 基質濃度為 3% w/v，

v) 最後蒸餾步驟為精餾，

vi) (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇在精神病症中係用作 API 之基本組份，

vii) 如 WO 2005/014563 中所述，(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇係用作 API 之基本組份，

viii) 可製備如 WO 2005/014563 中所述之具有大於 99% ee 異構性純度之 API。

藉由焙用酵母進行 1,1,1-三氟丙酮之高鏡像異構性不對稱還原之障礙為 (部分亦如所引用文獻所示) 熱處理之反作用，一方面增加立體選擇性 (藉由明顯主要使較少選擇性

還原酶失活)且另一方面降低活性(亦藉由明顯使選擇性酶失活)。預期在更高、技術上更相關(但生理學上較不有利)之基質濃度下，該障礙可能更明顯。

令人驚訝地，現已發現存在對於焙用酵母之熱處理極其窄之條件範圍(於50-52°C下歷時90-240 min)以顯著降低不需要酶之活性而不過多影響選擇性酶之活性及穩定性。

此經預處理之焙用酵母可隨後用於藉由無需使用另外之酶抑制劑而還原1,1,1-三氟丙酮來製備具有大於99% ee之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，在仍技術上相關之基質濃度及30% w/v酵母之可接受生物質量濃度(相對於基質10倍過量之酵母)下使處理程序具有極佳產率。

由於基質價格高，幾乎定量還原基質而無需輔酶再生系統對於該方法係同樣重要。已發現在選擇性不足與催化劑失活之間，對於熱處理存在一極窄溫度範圍。

此外，不僅焙用酵母為市售，且因此不需醱酵設備製備生物催化劑以執行該方法，而且該焙用酵母亦極其廉價。因此，此有助於該方法之經濟性。

該方法亦可使用來自其他製造商之焙用酵母進行，例如來自DSM (Dordrecht, The Netherlands)、Proofex (Dublin, Ireland)、S.I. de Leuvre Fala (Strasbourg, France)、Suomen Hiiva Oy (Lahti, Finland)或Hefe Fabrik Giegold (Schwarzenbach, Germany)。在所有情況下，於50°C下熱處理後之生物轉化中所產生之TFIP的鏡像異構體過量為大於等於99% (參見下表)。該熱處理對所有測試酵母之選擇性

具有大致類似之效應，此表明任何市售焙用酵母均可用於上述方法中。

酵母供應商	熱處理	EtOH (g/L)	TFIP產率 (%)	R-TFIP (%)	S-TFIP (%)
Klipfel	否	1.1	94.8	2.1	97.9
Klipfel	是	0.7	73.5	0.2	99.8
DSM	否	5.0	88.3	3.1	96.1
DSM	是	6.3	67.8	0.4	99.6
Proofex	否	0.2	31.1	1.5	98.5
Proofex	是	0.0	38.8	0.4	99.6
Fala	否	5.3	96.9	2.2	98.8
Fala	是	3.1	80.2	0.2	99.8
Suonenhiiva	否	3.9	91.7	1.9	98.1
Suonenhiiva	是	4.2	64.7	0.5	99.5
Giegold	否	7.5	70.0	2.4	97.6
Giegold	是	4.7	42.0	0.6	99.4

如下達成該等結果：

將 50 g 每一酵母懸浮於 0.1 M 磷酸鉀緩衝液 pH 7.4 中達 100 ml 最終體積，且將其轉移至 250 ml 玻璃瓶中。使所懸浮之酵母於 50°C 下在熱水浴中經受熱處理 2 小時。以冰冷卻後，用緩衝液將酵母稀釋至 30% w/v。接著將 2.5 ml 等分試樣轉移至 10 ml 血清瓶中且添加 86 μ l 之 940 g/L TFAC 水溶液，以得到 3% w/v 之最終濃度。在用橡膠墊片封閉後，將該等瓶於 20°C 下旋轉培養 6 天。按時將樣品移出且藉由 GC 及對掌性 GC 進行分析以量化 TFAC (1,1,1-三氟丙酮)、EtOH (乙醇) 及 TFIP (1,1,1-三氟-2-丙醇) 及測定產物之鏡像異構體過量。

此外，且同樣重要的是，已發現一自該高密度生物肉湯

中回收高純度及高產率之產物之簡單且出乎意料的有效處理程序。該方法係僅基於蒸餾。萃取溶劑並不用於回收產物。

製備(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之整個方法在形式上可分為三個步驟：

1. 焙用酵母之預處理

將酵母(2-4 kg)懸浮於磷酸鉀緩衝液中(pH=7.4)且使該懸浮液達6 L之所需最終體積。將懸浮液經60 min之時間加熱至50°C，且於該溫度下再保持90 min。90 min後停止加熱且添加另一部分冷磷酸鉀緩衝液以將酵母濃度調節至30% w/v。將懸浮液經90 min之時間冷卻至5-20°C。

2. 生物轉化

將1,1,1-三氟丙酮(0.15-0.3 kg)添加至步驟1中所得之經冷卻酵母懸浮液中且使溫度達20°C。為使反應肉湯中之乙醇濃度保持較低，藉由控制添加4 M KOH溶液將pH值保持在7.4至7.5。由於(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之沸點(沸點76-77°C)與乙醇之沸點(沸點78°C)非常相似，因此在反應混合物中之低乙醇濃度對於以高產率分離不含乙醇之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇係必須的。此態樣係該程序之一必須部分。

視情況，可以分批饋料型方法添加基質。

在本發明方法中所用之基質濃度顯著高於先前技術中所述之彼等濃度。由於反應及產物所需要之體積較少，因此較高體積產率導致大量成本節省。已發現，若反應時間為5-8天，則該基質可幾乎全部轉化。

3.(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之分離及純化

自步驟2中所得之生物肉湯中分離出(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。在第一批蒸餾中，產物體積以10之係數下降，且獲得約25% w/w之TFIP水溶液。出乎意料地，儘管生物肉湯之生物質量含量高(用以補償酶活性之損失)，但該產物可以幾乎定量之產率回收。

在第二批經由氯化鈉之蒸餾中，產物中之水含量進一步下降以提供約90% m/m之產物。或者，該第二批蒸餾可在無氯化鈉之情況下進行，提供約80% w/w之產物。

在第三次蒸餾中，於一填充塔上進行精餾，移除不需要之副產物，諸如痕量未反應之1,1,1-三氟丙酮及乙醇。最終以95% w/w產物獲得經純化之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，其中5%為水且小於0.2%為有機雜質。乙醇含量比較關鍵(因為其亦可能在隨後之反應步驟中進行反應且減少API純度)且應小於0.5%(w/w)，該含量對於生物轉化及處理係相當一挑戰。

視情況，無水(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇可藉由在最後蒸餾步驟之前或之後引入用分子篩之乾燥步驟，或藉由使用萃取蒸餾或全蒸發來製備。

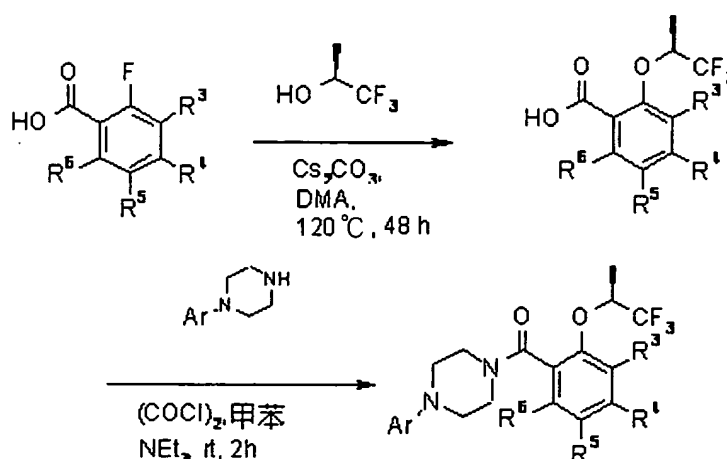
已展示酵母濃度增加至60% w/v導致達成95%產率之所需還原時間顯著降低(係數為2)，此可能導致在生產規模上之成本節省。在10 L規模之生物轉化中，將酵母濃度自30% w/v加倍至60% w/v之效應如下表所示：

實驗	酵母濃度 (w/v)	反應時間(h)	生物轉化產率(%)
A	30 %	66 138	78 94
B	30 %	66 138	84 95
C	60 %	66 138	96 -
D	60 %	66 138	98 -

如上所提及，所獲得之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇可用作用於製備具有S-構像1,1,1-三氟丙-2-基醚部分之醫藥活性化合物的基本組份。作為一實例，流程2展示使用此基本組份製備作為甘胺酸轉運體之抑制劑之醫藥活性化合物。此等化合物係揭示於WO 2005/014563中。

流程2中所製備之化合物含有S-構像之1,1,1-三氟丙-2-基醚部分，其在倒數第二個合成步驟中於彙集成成之一分枝中經由該(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇基本組份引入分子中(參見流程2)。

流程 2



至今未發現結晶程序用以鏡像異構性濃化中間體直到

API中。因此，對於API之合成而言，使用鏡像異構性純度大於99%之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇極為重要。

實例

實驗室規模

實例1(培用酵母之預處理)

將3.0 kg培用酵母(Blockhefe of Klipfel AG, Rheinfelden, Switzerland；產品編號101010)分散於0.1 M磷酸鉀緩衝液pH 7.4中且以相同緩衝液使體積達6 L(50% w/v)。隨後將所懸浮之酵母轉移至一15 L溫度受控制之玻璃反應器中。一安裝於頂端之攪拌器係用於混合(200 rpm)。隨後在60 min之時間內將該懸浮液自周圍溫度加熱至50°C且在該溫度下保持另外90 min。於此時停止加熱。隨後添加另外4 L冷緩衝液(4°C)以使總體積達10 L(30% w/v酵母)。將肉湯經約90 min之時間冷卻至10°C。藉由使用恆pH器自動添加4 M KOH溶液來將pH值保持在7.4至7.5。

熱處理		
時間 (min)	溫度 (°C)	所消耗之4 M KOH溶液(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

實例2(生物轉化)

將304 g 1,1,1-三氟丙酮添加至經冷卻之肉湯中(10 L)，且將溫度保持在20°C，歷時在該情況下為5天之反應持續時間。將容器中之反應肉湯不斷以氮氣覆蓋(出於安全原因)。藉由用恆pH器自動添加4 M KOH溶液將pH值保持在7.4至7.5。按時將樣品移出且藉由GC及對掌性GC進行分析以量化TFAC (1,1,1-三氟丙酮)、EtOH (乙醇)及TFIP (1,1,1-三氟-2-丙醇)及測定產物之鏡像異構體過量。

生物轉化					
反應時間 (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		

實例3(自生物肉湯及其濃化物中分離出(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇)

將10.9 kg生物肉湯轉移至一具有20 L圓底燒瓶、配備有一冷阱(乾冰)之Büchi R152旋轉蒸發儀中。蒸餾係於60°C浴溫、140毫巴真空下且於15°C冷凝溫度下進行。所觀測到之蒸餾溫度為55°C。在該冷阱中(兩相溶液)，將餾份1(參見下文)與所得產物組合。該等產物之組份係藉由GC進行分析。

第一次蒸餾				
產物描述	重量 (g)	TFAC (g)	EtOH (g)	TFIP (g)
肉湯	10919.0	26.2	21.8	262.2
餾份1及冷阱產物	1001.9	20.7	4.7	258.8
餾份2	548.4	4.3	3.4	1.0
蒸餾聚水坑	9539.0	1.2	13.8	2.5

將300 g氯化鈉添加至來自第一次蒸餾之產物(餾份1及來自冷阱之產物)中，且將混合物攪拌1小時。獲得TFIP、水相及氯化鈉之混合物。將整個混合物轉移至一具有2 L圓底燒瓶之Büchi R124旋轉蒸發儀中。該蒸餾係於90-98°C浴溫、周圍壓力下且於15°C冷凝溫度下進行。第一TFIP餾份係於82-85°C下獲得，第二餾份係於85-98°C下獲得。

第二次蒸餾					
產物描述	沸點 (°C)	重量 (g)	TFAC (g)	EtOH (g)	TFIP (g)
第一次蒸餾產物/NaCl		1301.9	20.7	4.7	258.8
餾份1	82-85	287.1	12.2	7.8	254.6
餾份2	85-98	9.2	0.3	0.5	7.5
蒸餾聚水坑		1003.1	0.1	6.9	3.8

藉由組合餾份1及2所獲得之產物係用於最後蒸餾。

實例4((S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之最後純化)

在自兩個10 L規模之生物轉化反應中第二次蒸餾後所獲得之625 g濃化(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇係用於最後分餾。使用與一5×150 cm蒸餾塔(Sulzer packing BX)相連之一1 L圓底燒瓶進行蒸餾。該塔在頂端配備有一分餾頭。該蒸餾係於150°C浴溫、周圍壓力下且於15°C冷凝溫度下進行。所選回流率(1:20至1:99)係視所得產物品質而定(藉由在GC上

監測)。餾出物排出之時間為1秒。

第三次蒸餾						
產物描述	RLV	沸點 (°C)	重量 (g)	TFAC (g)	EtOH (g)	TFIP (g)
起始物質	-		624.6	9.11	37.58	546.6
餾份1	1 : 20	59.0 - 76.4	86.0	8.69	0.08	76.0
餾份2	1 : 20	76.4 - 76.7	49.5	0.61	0.00	49.1
餾份3	1 : 20	76.7 - 76.8	49.1	0.28	0.00	50.3
餾份4	1 : 20	76.8 - 76.9	51.4	0.15	0.00	54.4
餾份5	1 : 20	76.9	47.7	0.08	0.00	50.9
餾份6	1 : 20	76.9	46.9	0.05	0.00	48.99
餾份7	1 : 40	76.9	26.4	0.02	0.02	27.56
餾份8	1 : 40	76.9 - 77.0	28.3	0.04	0.04	28.62
餾份9	1 : 40	77.0 - 77.4	33.7	0.03	0.18	35.01
餾份10	1 : 40	77.4 - 78.2	22.7	0.02	0.49	23.51
餾份11	1 : 40	78.2 - 78.3	3.26	0.01	0.14	2.88
餾份12	1 : 99	78.3 - 79.1	31.8	0.04	2.42	27.36
餾份13	1 : 99	79.1 - 79.3	23.1	0.02	3.27	16.81
蒸餾聚水坑	-		108.4	0.35	35.87	64.39

藉由組合餾份2至8(299 g)所獲得之最終產物展示下列分析資料：

根據NMR(CDCl₃)及HPLC/MS之一致性：一致；

組份(GC)：94.8% w/w TFIP、0.4% w/w TFAC、0.02% w/w 乙醇；

水含量(卡爾-費休(Karl-Fisher))：4.8% w/w；

鏡像異構體過量(對掌性GC)：99.3%。

大規模製備

實例5(培用酵母之預處理)

a)培用酵母之熱處理

以冷卻至10°C之240 L 0.1 M磷酸緩衝液pH 7.5填充至一

800 L不銹鋼反應容器中。藉由將10.88 kg磷酸二氫鉀(產品編號60220; Fluka/Switzerland)及4.08 kg氫氧化鉀(產品編號60370; Fluka/Switzerland)溶解於804 L去離子水中來製備該緩衝液。在攪拌下添加240 kg焙用酵母(產品編號104020, "Sackhefe"; Klipfel AG, Rheinfelden/Switzerland)。將混合物於10°C下進一步攪拌60 min以使該酵母懸浮液均勻。安裝一浸入懸浮液中之溫度探針且該反應器中無變化。將酵母懸浮液在83 min內加熱至50.3°C (+/- 0.5°C)且於50.3°C (+/- 0.5°C)下保持90 min。接著添加10°C之320 L 0.1 M磷酸緩衝液pH 7.5且將混合物在67 min內冷卻至10°C。在熱處理期間, 懸浮液之pH值係藉由控制(恆pH器)添加50%氫氧化鉀溶液(12.0 kg)而保持在pH 7.5。將所製得之酵母懸浮液於10°C下暫時儲存於反應容器中歷時25 h, 保持pH 7.5控制(消耗5.8 kg 50%氫氧化鉀溶液),

b)經熱處理之焙用酵母之使用測試

進行使用測試以驗證在添加高價1,1,1-三氟丙酮之前所製得酵母之所需活性/立體選擇性。將2 L經熱處理之酵母懸浮液置放於一2 L實驗室玻璃反應器中。在攪拌下將60 g 1,1,1-三氟丙酮添加至經冷卻之懸浮液(10°C)中。隨後將反應混合物在60 min內加熱至21°C。在生物轉化期間, 反應混合物之pH值係藉由控制(恆pH器)添加25%氫氧化鉀溶液(在20 h內添加16 g)而保持在pH 7.5。在20 h反應時間後, 獲得32%產率及99.2% ee之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇(測試準則: 在15-30 h反應時間後, 產率大於25%且ee大於

98.9%)。

實例6(生物轉化)

在攪拌下，將24.7 kg冰冷卻之1,1,1-三氟丙酮經由一傾斜管在55 min內轉移至經冷卻(10°C)之酵母懸浮液中。在攪拌另外20 min後，將反應混合物之溫度在55 min內上升至20°C。在生物轉化期間，反應混合物之pH值係藉由控制(恆pH器)添加50%氫氧化鉀溶液(在159 h內消耗16.8 g)而保持在pH 7.5。在159 h反應時間後，獲得96%產率及99.4% ee之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。獲得860 kg反應混合物。接著在開始蒸餾產物回收之前，將反應混合物於20°C下儲存1天且於6°C下儲存3天。

實例7(自肉湯及其濃化物中分離出(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇)

a)第一次蒸餾：

該蒸餾係在配備有一冷凝器之反應容器外進行。該蒸餾係於60°C夾套溫度、140毫巴壓力且於6-8°C冷凝器溫度下進行。為防止過量起泡，添加0.5 kg Basildon消泡劑(產品編號 BC 86/013；Basildon chemical Company Ltd/England)。藉由GC分析產物組份。該蒸餾提供101 kg包含乾冰冷阱中之產物之步驟1產物。該產物組份為19.8 m/m-% (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇、0.2% 1,1,1-三氟丙酮、2.5%乙醇及77.5%水。

b)第二次蒸餾：

在配備有一50 L蒸餾燒瓶之一Büchi R187旋轉蒸發儀上分各約30 L之三批進行步驟1產物之蒸餾。在90°C之浴溫

及12-15℃之冷凝器溫度下，在正常壓力下獲得第一餾份直至頂部溫度降至小於60℃。於700毫巴下獲得第二餾份且係於500毫巴下獲得第三餾份。所得餾份之品質係藉由GC進行分析且根據預設純度準則使用excel計算適當組份之混合(1,1,1-三氟-2-丙醇與乙醇之比率大於15)。總共獲得28.5 kg步驟2產物。該產物組份為79.3 m/m-% (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇、0.7% 1,1,1-三氟丙酮、4.9%乙醇及15.2%水。

c)第三次蒸餾：

在配備有一20 L圓底燒瓶之一5×150 cm精餾塔(Sulzer packing BX)上分各約14 kg之兩批進行步驟2產物之蒸餾。該精餾塔在頂端係配備有一分餾頭。該蒸餾係於115℃浴溫、周圍壓力及5℃冷凝器溫度下進行。所選回流率(1：10至1：50)係視所得產物品質而定(藉由在GC上監測)。餾出物排出之時間為1秒。根據預設純度準則使用excel計算適當純產物餾份之混合。含有5%共沸水及小於0.1%乙醇之純(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇於76.7℃至76.8℃下蒸餾。分兩批進行之蒸餾提供20.5 kg步驟3產物(準則：≥90% (S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，≤0.5%乙醇)及2.2 kg步驟3副產物(準則：≥80%(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，≤5%乙醇)，在精餾後其又產生1.4 kg步驟3產物。總共，該分餾提供21.8 kg經純化之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。

所產生(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之特性：

餾出物(21.8 kg)中之混合產物展示下列分析資料：

根據 NMR (CDCl_3) 及 HPLC/MS 之一致性：一致；

組份 (GC)：95.1% w/w TFIP、<0.1% w/w TFAC、<0.1% w/w 乙醇；

水含量 (卡爾-費休)：5.2% w/w；

鏡像異構體過量 (對掌性 GC)：99.4%。

參考文獻：

Crawford, J. W. C. Journal of the Chemical Society (C) (1967), 2332-2333: Resolution of 1-trifluoromethylethanol. 部分 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. 及 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.及 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: Assymetry (1996) 7, 409-412: enantio- and regioselective reduction of alpha-diketones by baker's yeast °

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於藉由 1,1,1-三氟丙酮之不對稱還原以生物催化劑來製備鏡像異構性純(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇(大於 99%鏡像異構體過量(enantiomeric excess))。

【先前技術】

鏡像異構性純(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇係製備用於治療神經病症及神經精神異常之異構性純有效藥劑成份(API)之重要基本組份。為製備 API，絕對有必要使用異構性純基本組份及/或高度立體選擇性程序，因為 API 中之次要組份可能在疾病治療中具有不利效應。因此，要求所有 API 具有高純度。

本發明之目的係製備具有大於 99%鏡像異構體過量(ee)之鏡像異構性純(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，(例如)如 WO 2005/014563 中所述，其可用作用於製備鏡像異構性純 API 之關鍵基本組份。由於對於個別 API，在合成中該基本組份(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之鏡像異構性純度或其隨後中間體之鏡像異構性純度皆不可濃化，因此在合成中使用大於 99% ee 之(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇極為重要。

J. W. C. Crawford (1967), J. Chem. Soc. (C) 2332-2333，描述一產生(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇之方法，其中將(±)-1-(三氟甲基乙氧基)丙酸(乙醇與丙烯酸之加合物)經由其奎寧鹽分離成其光學異構體，且藉由鹼性水解及蒸餾自鏡像異構性純烷氧基酸獲得純(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。儘管該方法

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種藉由以焙用酵母進行 1,1,1-三氟丙酮之不對稱微生物還原來製備具有大於 99% 鏡像異構體過量之 S-1,1,1-三氟-2-丙醇的可縮放生物催化方法。

六、英文發明摘要：

The invention relates to a scalable biocatalytic process for the preparation of S-1,1,1-trifluoro-2-propanol with a enantiomeric excess of > 99 % by asymmetric microbial reduction of 1,1,1-trifluoroacetone with Baker's yeast.

十、申請專利範圍：

1. 一種藉由以焙用酵母進行1,1,1-三氟丙酮之不對稱微生物還原來製備具有大於99%鏡像異構體過量(enantiomeric excess)之S-1,1,1-三氟-2-丙醇的可縮放生物催化方法，該方法包含以下步驟：
 - a)將焙用酵母於0.1-0.4 M磷酸緩衝液中之懸浮液經60 min之時間加熱至50-52°C，
 - b)於50-52°C下將該懸浮液保持另外90 min之時間，
 - c)用緩衝液稀釋該經加熱之懸浮液至酵母濃度為20-30% w/v且在120 min內冷卻至10°C，
 - d)在該整個方法中藉由自動添加4 M KOH溶液將pH值保持恆定在7.4至7.5，
 - e)於低於1,1,1-三氟丙酮之沸點之溫度下，添加1,1,1-三氟丙酮至濃度為1-5 % (w/v)以進行生物轉化，
 - f)於20°C下在5至8天內將1,1,1-三氟丙酮還原為(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇，及
 - g)藉由一系列蒸餾步驟分離該(S)-1,1,1-三氟-2-丙醇。
2. 如請求項1之生物催化方法，其中該生物轉化係於室溫下進行5-8天。
3. 如請求項1之生物催化方法，其特徵在於所用之該緩衝液為0.1 M磷酸緩衝液pH 7-8。
4. 如請求項1之生物催化方法，其特徵在於基質濃度為2-4% w/v。
5. 如請求項4之生物催化方法，其特徵在於基質濃度為3%

w/v。

6. 如請求項1之生物催化方法，其中最後該蒸餾步驟為精餾。