

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 500 910 A1 2006-04-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 130/2004**(51) Int. Cl.⁸: **C07C 201/12** (2006.01),(22) Anmeldetag: **30.01.2004****C12P 13/00** (2006.01)(43) Veröffentlicht am: **15.04.2006**

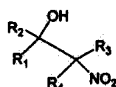
(73) Patentanmelder:

DSM FINE CHEMICALS AUSTRIA NFG
GMBH & CO KG
A-4021 LINZ (AT)

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BETA-HYDROXYNITROVERBINDUNGEN

(57) Bei einem Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I)

(I)



in der R_1 und R_2 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituierten C_1 - C_{20} -Alkyl-, C_6 - C_{14} -Aryl-, C_1 - C_{14} -Heteroarylrest, sowie Kombinationen davon oder gemeinsam einen gegebenenfalls substituierten C_3 - C_8 -Cycloalkylrest, der ein oder mehrere Heteroatome im Rest enthalten kann, bedeuten, oder einer der Reste Wasserstoff bedeutet, und R_3 und R_4 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls substituierten C_1 - C_{20} -Alkylrest, der gegebenenfalls zusätzlich einen substituierten oder nicht-substituierten C_6 - C_{14} -Aryl- oder C_1 - C_{14} -Heteroarylrest trägt, oder Wasserstoff bedeuten, wobei ein Aldehyd oder ein Keton der Formel (II)

(II)



in der R_1 und R_2 wie oben definiert sind, mit einem Nitroalkan der Formel (III)



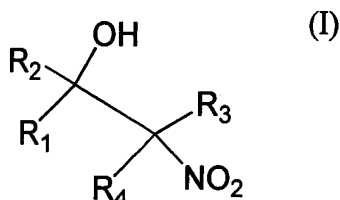
in der R_3 und R_4 wie oben definiert sind, zu den entsprechenden β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I) umgesetzt wird, wird die Umsetzung in Gegenwart einer Hydroxynitrilase durchgeführt.

AT 500 910 A1 2006-04-15

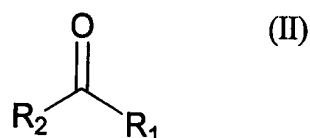
Zusammenfassung:

Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen

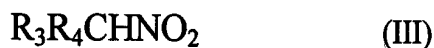
Bei einem Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I)



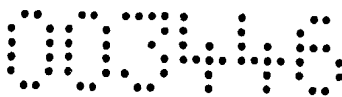
in der R_1 und R_2 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituierten C_1 - C_{20} -Alkyl-, C_6 - C_{14} -Aryl-, C_1 - C_{14} -Heteroarylrest, sowie Kombinationen davon oder gemeinsam einen gegebenenfalls substituierten C_3 - C_8 -Cycloalkylrest, der ein oder mehrere Heteroatome im Rest enthalten kann, bedeuten, oder einer der Reste Wasserstoff bedeutet, und R_3 und R_4 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls substituierten C_1 - C_{20} -Alkylrest, der gegebenenfalls zusätzlich einen substituierten oder nicht-substituierten C_6 - C_{14} -Aryl- oder C_1 - C_{14} -Heteroarylrest trägt, oder Wasserstoff bedeuten, wobei ein Aldehyd oder ein Keton der Formel (II)



in der R_1 und R_2 wie oben definiert sind, mit einem Nitroalkan der Formel (III)



in der R_3 und R_4 wie oben definiert sind, zu den entsprechenden β -Hydroxynitroverbindungen der Formel(I) umgesetzt wird, wird die Umsetzung in Gegenwart einer Hydroxynitrilase durchgeführt.



Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen

β -Hydroxynitroverbindungen sind wichtige Bausteine in der Synthese wertvoller biologisch aktiver Substanzen. Sie können durch die Henry-Reaktion durch Umsetzung eines Aldehyds oder Ketons mit einem Nitroalkan synthetisiert werden. Je nach Struktur der Ausgangsmaterialien werden dabei bis zu zwei Chiralitätszentren neu gebildet. Die so erhaltenen Produkte können Folgereaktionen unterworfen werden, beispielsweise durch Überführung in die entsprechenden Aminoalkohole oder β -Hydroxycarbonylverbindungen.

Die Herstellung dieser β -Hydroxynitroverbindungen erfolgt durch die Anlagerung des Nitroalkans an die Carbonylgruppe des Aldehyds oder Ketons, wobei im Falle des Einsatzes von Aldehyden oder unsymmetrischen Ketonen als Reaktionspartner Enantiomerengemische optisch aktiver Nitroalkohole entstehen.

Da in einem Isomerengemisch einer biologisch aktiven Substanz in der Regel nur ein Isomer das gewünschte Eigenschaftsprofil aufweist, ist die Entwicklung stereoselektiver Prozesse von großer Bedeutung. Um dies zu erreichen, ist bekannt, die Anlagerung von Nitroalkanen an Carbonylverbindungen in Gegenwart eines chiralen Katalysators durchzuführen, wobei eine Anreicherung eines Stereoisomers in der Reaktionsmischung erzielt werden kann. Allerdings ist die Stereoselektivität dieser Prozesse in der Regel gering.

So ist etwa in der EP 0 947 498 A ein diastereoselektives und enantioselektives Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven, nichtracemischen Nitroalkoholen durch Umsetzung von Aldehyden mit Nitroalkanen oder Nitroethanol in Gegenwart von Heterobimetallkatalysatoren beansprucht.

Die EP 0 960 876 A beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von (1R, 2S)-1-Phenyl-2-nitroalkoholen durch Umsetzung von Benzaldehyd mit Nitroalkanen in Gegenwart von Aminen bei Temperaturen unter 0°C. Die erzielten Enantioselektivitäten sind allerdings nur gering. Ein ähnlicher Prozess wird in der US 5962737 A beschrieben, wobei die dabei gewonnenen Enantiomere der racemischen *threo*-Nitroalkohole nach Reduktion zu den entsprechenden Aminoalkoholen durch Einwirkung von Weinsäuresalzen getrennt werden.

Die US 4933505 A beschreibt ein Verfahren zur Durchführung einer diastereoselektiven Nitroaldolreaktion in Anwesenheit von nichtchiralen Lewissäuren auf Titan-, Zirkon- oder Aluminiumbasis. Hierbei ist allerdings die Verwendung von Lithiumnitronatanionen anstelle

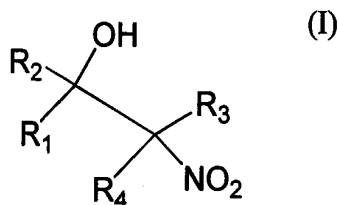
von Nitroalkanen und die Einhaltung tiefer Temperaturen erforderlich.

Enantiomerenangereicherte Produkte können mit dieser Methode nicht erhalten werden.

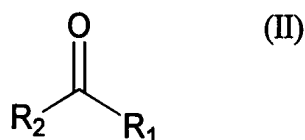
Die enantioselektive Addition von Nitromethan an Aldehyde kann gemäß Angew. Chem. 2002, 114, 889 – 891 in Gegenwart von dinuklearen Zinkkatalysatoren mit chiralen, nichtracemischen Liganden, gemäß J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 12692 – 12693 in Gegenwart von chiralen, nichtracemischen Bisoxazolin-kupferkomplexen, oder gemäß Tetrahedron: Asymmetry 1994, 5, 1393 – 1402 in Gegenwart von chiralen, nichtracemischen Guanidinderivaten durchgeführt werden.

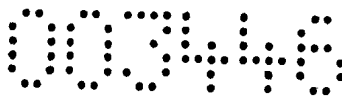
Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, das die Herstellung von enantiomerenreinen oder -angereicherten β -Hydroxynitroverbindungen aus den korrespondierenden Carbonylverbindungen auf einfache Weise, in hohen Ausbeuten und mit hoher Diastereomeren- und Enantiomerenreinheit ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I)

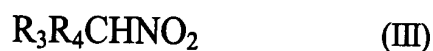


in der R_1 und R_2 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituierten C_1 - C_{20} -Alkyl-, C_6 - C_{14} -Aryl-, C_1 - C_{14} -Heteroarylrest, sowie Kombinationen davon oder gemeinsam einen gegebenenfalls substituierten C_3 - C_8 -Cycloalkylrest, der ein oder mehrere Heteroatome im Rest enthalten kann, bedeuten, oder einer der Reste Wasserstoff bedeutet, und R_3 und R_4 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls substituierten C_1 - C_{20} -Alkylrest, der gegebenenfalls zusätzlich einen substituierten oder nicht-substituierten C_6 - C_{14} -Aryl- oder C_1 - C_{14} -Heteroarylrest trägt, oder Wasserstoff bedeuten, wobei ein Aldehyd oder ein Keton der Formel (II)





in der R_1 und R_2 wie oben definiert sind, mit einem Nitroalkan der Formel (III)



in der R_3 und R_4 wie oben definiert sind, zu den entsprechenden β -Hydroxynitroverbindungen der Formel(I) umgesetzt wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die Umsetzung in Gegenwart einer Hydroxynitrillyase durchgeführt wird.

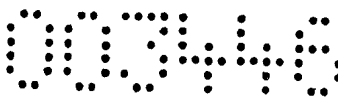
Unerwarteterweise konnte die Aufgabe durch die Anlagerung von Nitroalkanen an das Carbonylkohlenstoffatom von Aldehyden und unsymmetrischen Ketonen in Gegenwart einer Hydroxynitrillyase gelöst werden.

Aldehyde oder Ketone, die sich für das erfindungsgemäße Verfahren eignen, sind bekannt oder wie üblich herstellbar.

Unter C_1 - C_{20} -Alkyl sind gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte, lineare, verzweigte oder cyclische, primäre, sekundäre oder tertiäre Kohlenwasserstoffreste zu verstehen. Dies sind beispielsweise C_1 - C_{20} -Alkylreste wie etwa Methyl, Ethyl, Propyl, iso-Propyl, Propenyl, Butyl, iso-Butyl, t-Butyl, Butenyl, 1,3-Butadienyl, Butinyl, Pentyl, Cyclopentyl, iso-Pentyl, neo-Pentyl, Pentenyl, Pentinyl, Hexyl, iso-Hexyl, Cyclohexyl, Cyclohexylmethyl, 3-Methylpentyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, Octyl, Cyclooctyl, Decyl, Cyclodecyl, Dodecyl, Cyclododecyl, u.s.w.

Bei diesen Resten können aber auch ein oder mehrere C-Atome in der Kette durch ein Sauerstoffatom, ein Stickstoffatom, ein Schwefelatom, oder eine SO- oder SO_2 -Gruppe ersetzt sein, sodass Ether, Amide, Amine, Imine, Thioether, Sulfoxide und Sulfonyle erhalten werden.

Die Alkylgruppe kann gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch unter den Reaktionsbedingungen inerte Gruppen substituiert sein. Geeignete Substituenten sind beispielsweise gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen, wie Phenyl-, Phenoxy- oder Indolylgruppen, Halogen-, Cyano-, Hydroxy-, Hydroxy- C_1 - C_5 -Alkyl-, C_1 - C_6 -Alkoxy-, Aryloxy-, C_1 - C_6 -Alkylthio-, Amino-, Alkylamino-, Arylamino-, Ether-, Thioether-, Carbonyl-, Alkoxy-carbonyl-, Carboxyl-, Carbonsäureester-, Carbonsäureamid-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Sulfonsäureester-, Sulfinsäure-, Mercaptan-, Nitro- oder Azidogruppen.



Unter C₃-C₈-Cycloalkylgruppen sind cyclische Kohlenwasserstoffe zu verstehen, wie etwa Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl u.s.w. Bei diesen Resten können auch ein oder mehrere C-Atome in der Kette durch ein Sauerstoffatom, ein Stickstoffatom, ein Schwefelatom, oder eine SO- oder SO₂-Gruppe ersetzt und / oder gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch die bereits oben angeführten Substituenten substituiert sein.

Unter Aryl sind bevorzugt C₆-C₁₄-Arylgruppen zu verstehen, wie etwa Pheny, Biphenyl, Naphthyl, Indenyl, Fluorenyl, u.s.w. Die Arylgruppe kann dabei gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch die bereits oben angeführten Substituenten substituiert sein.

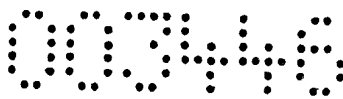
Unter Heteroaryl sind cyclische Reste zu verstehen, die zumindest ein S-, O- oder N-Atom im Ring enthalten. Dies sind beispielsweise Pyrrolyl, Pyrazolyl, Imidazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl, Furyl, Thienyl, Oxazolyl, Isoxazolyl, Thiazolyl, Isothiazolyl, 1,2,4-Oxadiazolyl, 1,2,4-Thiadiazolyl, Pyridyl, Pyridazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazinyl, Indolyl, Isoindolyl, Benzofuryl, Isobenzofuryl, Benzothienyl, Chinolyl, Isochinolyl, Benzimidazolyl, Purinyl, Carbazolyl, Chinazolyl, Phthalazinyl, u.s.w. Die Heteroarylgruppe kann dabei gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch die bereits oben angeführten Substituenten substituiert sein.

Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich Hydroxynitrillyasen sowohl in nativer als auch in rekombinanter Form, die entweder als solche oder immobilisiert vorliegen können. Es ist nicht notwendig, dass diese Enzyme in reiner Form vorliegen, sondern sie können auch in Form von ganzen Zellen oder Rohlysaten eingesetzt werden. Insbesondere eignen sich die Hydroxynitrillyasen (HNLs) aus *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta*, *Sorghum sp.*, *Prunus amygdalus* oder *Prunus serotina*. Bevorzugt werden Hydroxynitrillyasen aus *Hevea brasiliensis* und *Prunus amygdalus* verwendet.

Geeignete rekombinante HNLs werden beispielsweise aus gentechnisch modifizierten Mikroorganismen, wie etwa *Pichia pastoris*, *E. Coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* erhalten. Bevorzugt werden rekombinante HNLs aus *Pichia pastoris* eingesetzt.

Die erfindungsgemäße Reaktion findet vorzugsweise im organischen, wässrigen oder Zweiphasensystem oder in Emulsion statt.

Dabei wird im wässrigen System eine wässrige, eine Hydroxynitrillyase enthaltende Lösung oder Pufferlösung verwendet. Beispiele dafür sind Acetatpuffer, Boratpuffer, Phthalatpuffer,



Citratpuffer, Phosphatpuffer u.s.w oder Gemische dieser Pufferlösungen. Der pH-Wert dieser Lösung liegt dabei bei pH 2 bis 9.

Als organische Phase können mit Wasser nicht oder geringfügig mischbare aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, die gegebenenfalls halogeniert sind, Alkohole, Ether oder Ester oder Gemische davon verwendet werden. Geeignet sind beispielsweise Benzol, Toluol, Xylol, Diethylether, Diisopropylether, t-Butylmethylether, Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan, 1,1,1-Trichlorethan, 1,1,2-Trichlorethan, 1,1,2,2-Tetrachlorethan, Nitromethan, Nitroethan, Essigsäureethylester, Essigsäureisopropylester oder Essigsäurebutylester. Als wassermischbare Lösungsmittel können Alkohole oder aprotisch dipolare Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid, Formamid oder Dimethylformamid verwendet werden. Auch die sogenannten ionischen Flüssigkeiten sind als Lösungsmittel geeignet. Die Umsetzung kann jedoch auch in einem Zweiphasensystem oder in Emulsion erfolgen.

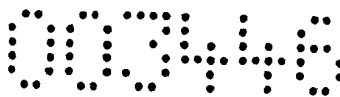
Die Reaktionsmischung wird bei Temperaturen von etwa -5 bis $+50^{\circ}\text{C}$, bevorzugt bei 0 bis 20°C , insbesondere bei Raumtemperatur, gerührt oder geschüttelt.

Pro g Aldehyd oder Keton werden etwa 10 bis 300 g Verdünnungsmittel zugesetzt. Pro Mol eingesetzte Aldehyd- oder Ketogruppe werden mindestens ein Mol, bevorzugt 5 bis 15 Mole, Nitroalkan zugegeben.

Dabei wird das Nitroalkan auf das Carbonylkohlenstoffatom des eingesetzten Aldehyds oder Ketons übertragen und es entsteht eine enantiomerenreine oder -angereicherte, dem eingesetzten Aldehyd oder Keton entsprechende, optisch aktive β -Hydroxynitroverbindung.

Vorzugsweise werden als Verbindung der Formel (II) ein gegebenenfalls substituierter Benzaldehyd und als Nitroalkan der Formel (III) Nitromethan oder Nitroethan eingesetzt. Bevorzugte Benzaldehyde sind beispielsweise 2-, 3-, 4-Chlorbenzaldehyd, 2-, 3-, 4-Brombenzaldehyd, 2-, 3-, 4-Hydroxybenzaldehyd, 2-, 3-, 4-Methylbenzaldehyd, 2-, 3-, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-, 3-, 4-Phenoxybenzaldehyd, 1,3-Dihydroisobenzofuran-5-carbaldehyd. Als Nitroalkan sind auch 1-, 2-Nitropropan, Nitroethanol, Nitroessigsäure, Nitroaceton bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Aminoalkoholen, welches dadurch gekennzeichnet, dass entsprechende β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I) nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt und anschließend reduziert werden.



Hierzu kann beispielsweise eine Hydrierung mit Pd/C, Raney Nickel, PtO₂ bzw. NaBH₄, LiAlH₄, Säure (Essigsäure, HCl, H₂SO₄) / Metall (Pt; Sn, Fe, In, Zn) durchgeführt werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1:

250 µl Benzaldehyd (2,46 mmol) wurden in 1 ml *tert*-Butylmethylether gelöst und mit 5 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (5000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, pH 6,5) versetzt. Nach Zugabe von 1,40 ml Nitromethan (25,85 mmol) wurde für 25 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Extraktion mit Ethylacetat, Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat, Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographische Reinigung ergab optisch aktives (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol als einheitliche Substanz (118 mg farbloses Öl, 45 % isolierte Ausbeute).

$[\alpha]_D^{20} + 19,4^\circ$ (c 1,16 C₂H₅OH)

ee = 88 % (HPLC)

¹H-NMR: δ (ppm) = 2.90 (br. s, 1H), 4.52 (dd, *J*=13Hz, *J*=3Hz, 1H), 4.61 (dd, *J*=13Hz, *J*=10Hz, 1H), 5.46 (dd, *J*=10Hz, *J*=3Hz, 1H), 7.36-7.84 (m, 5H)

¹³C-NMR: δ (ppm) = 71.25, 81.46, 126.19, 129.24, 129.29, 138.36

IR: 3545, 3034, 2921, 1565, 1379 cm⁻¹

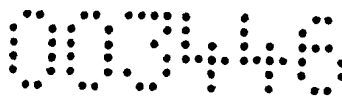
CHN-Analyse: berechnet C 57.48% H 5.43% N 8.38%; gefunden C 57.53% H 5.57% N 8.26%

Beispiel 2:

305 µl Benzaldehyd (3,00 mmol) wurden in 4,4 ml *tert*-Butylmethylether gelöst und mit 4 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 2 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) versetzt. Nach 10 Minuten wurden 1,62 ml Nitromethan (30,15 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 26 Stunden wurden 84 % (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 84 % erhalten.

Beispiel 3:

305 µl Benzaldehyd (3,00 mmol) wurden in 4,4 ml *tert*-Butylmethylether gelöst und mit 4 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 2 ml 100 mM Natriumcitratpuffer pH 4,8) versetzt. Nach 10



Minuten wurden 1,62 ml Nitromethan (30,15 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 26 Stunden wurden 8 % (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 84 % erhalten.

Beispiel 4:

Zu 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (5000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, pH 6,5) wurden 10 ml *tert*-Butylmethylether und anschließend 102 µl Benzaldehyd (1,00 mmol) und 537 µl Nitromethan (9,99 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 19 Stunden wurde (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 96 % erhalten.

Beispiel 5:

Zu 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (5000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, pH 6,5) wurden 10 ml *tert*-Butylmethylether und anschließend 102 µl Benzaldehyd (1,00 mmol) und 537 µl Nitromethan (9,99 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei 30°C gerührt. Nach 72 Stunden wurde (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 91 % erhalten.

Beispiel 6:

Zu 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (5000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, pH 6,5) wurden 10 ml Ethylacetat und anschließend 102 µl Benzaldehyd (1,00 mmol) und 537 µl Nitromethan (9,99 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 18 Stunden wurde (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 97 % erhalten.

Beispiel 7:

152 µl Benzaldehyd (1,50 mmol) wurden in 2,2 ml Methylpropylimidazoliumtetrafluoroborat vorgelegt. Anschließend wurde mit 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 1 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) versetzt. Nach 10 Minuten wurden 800 µl Nitromethan (14,89 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Stunden wurden 12 % (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 32 % erhalten.

Beispiel 8:

Zu 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (4200 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 0,5 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) und 1,5 ml *tert*-Butylmethylether wurden 151 mg *p*-Nitrobenzaldehyd (1,00 mmol) und 537 μ l Nitromethan (9,99 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugieren getrennt. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert, säulenchromatographische Reinigung ergab optisch aktives 2-Nitro-1-(4-nitrophenyl)ethanol als einheitliche Substanz (67 mg gelber Feststoff, 32 % isolierte Ausbeute).

ee = 26 % (HPLC)

mp 71°C

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm) = 3.46 (br. s, 1H), 4.58 (dd, $J=14\text{Hz}$, $J=4\text{Hz}$, 1H), 4.61 (dd, $J=14\text{Hz}$, $J=8\text{Hz}$, 1H), 5.61 (dd, $J=8\text{Hz}$, $J=4\text{Hz}$, 1H), 7.63 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 8.25 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm) = 70.22, 80.91, 124.39, 127.21, 145.43, 148.34

Beispiel 9:

Zu 6,9 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 3,5 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) und 7,6 ml Toluol wurden 0,67 ml 3-Phenylpropanal (5,12 mmol) und nach 5 Minuten 2,75 ml Nitromethan (51,20 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Celite-545TM und Filtration über Celite-545TM und wasserfreiem Na_2SO_4 wurde das verbleibende Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Säulenchromatographische Reinigung ergab optisch aktives 4-Phenyl-1-nitro-2-butanol als einheitliche Substanz (189 mg weißer Feststoff, 19 % isolierte Ausbeute).

ee = 73 % (HPLC)

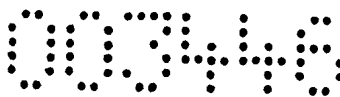
mp 96 - 100°C

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm) = 1.75 - 1.93 (m, 2H), 2.60 - 2.70 (br. s, 1H), 2.71 - 2.90 (m, 2H), 4.28 - 4.34 (m, 1H), 4.39 - 4.42 (m, 2H), 7.19 - 7.34 (m, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm) = 31.56, 35.33, 67.98, 80.79, 126.59, 128.67, 128.91, 140.84

Beispiel 10:

Zu 6,9 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 3,5 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) und 7,6 ml Toluol



wurden 0,42 ml 2-Furaldehyd (5,00 mmol) und nach 5 Minuten 2,69 ml Nitromethan (50,00 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Celite-545™ und Filtration über Celite-545™ und wasserfreiem Na₂SO₄ wurde das verbleibende Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Säulenchromatographische Reinigung ergab optisch aktives 1-(Furan-2-yl)-2-nitroethanol als einheitliche Substanz (164 mg gelbes Öl, 20 % isolierte Ausbeute).

ee = 42 % (HPLC)

¹H-NMR: δ (ppm) = 2.96 (br s, 1H), 4.65 (dd, $J=14\text{Hz}$, $J=3\text{Hz}$, 1H), 4.76 (dd, $J=14\text{Hz}$, $J=9\text{Hz}$, 1H), 5.45 (dd, $J=9\text{Hz}$, $J=3\text{Hz}$, 1H), 3.35 – 6.38 (m, 2H), 7.40 (d, $J=2\text{Hz}$, 1H)

¹³C-NMR: δ (ppm) = 65.08, 78.61, 108.47, 110.92, 143.45, 150.90

Beispiel 11:

Zu 8,4 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrilase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 4,2 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) und 9,2 ml Toluol wurden 0,75 ml Hexanal (6,20 mmol) und nach 5 Minuten 3,33 ml Nitromethan (62,00 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde 45 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Celite-545™ und Filtration über Celite-545™ und wasserfreiem Na₂SO₄ wurde das verbleibende Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Säulenchromatographische Reinigung ergab optisch aktives 1-Nitro-2-heptanol als einheitliche Substanz (190 mg farbloses Öl, 19 % isolierte Ausbeute).

ee = 90 % (HPLC)

¹H-NMR: δ (ppm) = 0.89 (t, $J=6\text{Hz}$, 3H), 1.22 – 1.38 (m, 5H), 1.40 – 1.56 (m, 3H), 2.65 (br s, 1H), 4.28 – 4.33 (m, 1H), 4.37 (dd, $J=13$, $J=9$, 1H), 4.43 (dd, $J=13$, $J=3$, 1H),

¹³C-NMR: δ (ppm) = 14.17, 22.70, 25.08, 31.69, 33.93, 68.95, 80.92

Beispiel 12:

7,4 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrilase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*) wurden mit 3,7 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) und 7,1 ml *tert*-Butylmethylether bis zur Bildung einer Emulsion gerührt. Anschließend wurden 0,56 ml Benzaldehyd (2,52 mmol) und nach 5 Minuten 4,1 ml Nitroethan (55,19 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Durch Zugabe von Celite™ und Filtration über Celite™ und Na₂SO₄ wurden Enzym und Wasser entfernt. Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographische Reinigung ergab optisch aktives 2-Nitro-1-phenylpropanol als Diastereomergemisch (655 mg farbloses Öl, 67 % isolierte Ausbeute).

erythro / *threo* = 9 / 1

$ee_{erythro}$ 95 % (HPLC)

ee_{threo} 53 % (HPLC)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm) = *erythro*: 1.50 (d, $J=7$ Hz, 3H); 2.65-2.70 (br. s, 1H); 4.70 (dq, $J=7$ Hz, $J=3$ Hz, 1H); 5.40 (d, $J=3$ Hz, 1H); 7.35-7.45 (m, 5H); *threo*: 1.32 (d, $J=7$ Hz, 3H); 2.60-2.65 (br. s, 1H); 4.78 (dq, $J=9$ Hz, $J=7$ Hz, 1H); 5.02 (d, $J=9$ Hz, 1H); 7.35-7.45 (m, 5H);

$^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm) = *erythro*: 12.3, 74.1, 87.7, 126.2, 128.8, 129.0, 138.7; *threo*: 14.4, 76.5, 88.7, 127.2, 129.3, 129.5, 138.5

Beispiel 13:

152 μl Benzaldehyd (1,50 mmol) wurden in 1,9 ml *tert*-Butylmethylether gelöst und mit 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (4200 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, pH 9,0) versetzt. Anschließend wurden 1,1 ml Nitroethan (15,39 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 19 Stunden wurden 67 % 2-Nitro-1-phenylpropanol als Diastereomerengemisch erhalten.

$ee_{erythro}$ 97 %

ee_{threo} 45 %

Beispiel 14:

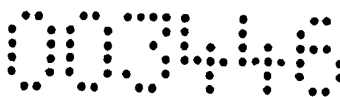
152 μl Benzaldehyd (1,50 mmol) wurden in 1,9 ml Dichlormethan gelöst und mit 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 1 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) versetzt. Nach 10 Minuten wurden 1,1 ml Nitroethan (15,39 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 Stunden wurden 22 % 2-Nitro-1-phenylpropanol als Diastereomerengemisch erhalten.

$ee_{erythro}$ 94 %

ee_{threo} 55 %

Beispiel 15:

152 μl Benzaldehyd (1,50 mmol) wurden in 1,9 ml Toluol gelöst und mit 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 1 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) versetzt. Nach 10 Minuten wurden 1,1 ml Nitroethan (15,39 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 Stunden wurde 2-Nitro-1-phenylpropanol als Diastereomerengemisch erhalten.



$ee_{erythro}$ 94 %

ee_{threo} 55 %

Beispiel 16:

152 μ l Benzaldehyd (1,50 mmol) wurden in 1,9 ml Ethylacetat gelöst und mit 2 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 1 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) versetzt. Nach 10 Minuten wurden 1,1 ml Nitroethan (15,39 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 Stunden wurden 40 % 2-Nitro-1-phenylpropanol als Diastereomerengemisch erhalten.

$ee_{erythro}$ 96 %

ee_{threo} 50 %

Beispiel 17:

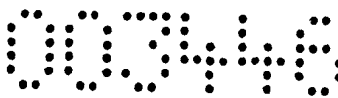
Zu 1,35 ml einer Lösung von rekombinanter (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* (3000 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 0,68 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) wurden 1,57 ml *tert*-Butylmethylether und anschließend 51 μ l Benzaldehyd (0,50 mmol) und 451 μ l 2-Nitropropan (5,00 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 48 Stunden wurde 2-Methyl-2-nitro-1-phenylpropanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 83 % erhalten.

Beispiel 18:

Zu 100 μ l einer Lösung von (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Manihot esculenta* (6696 IU/ml + 900 μ l 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) und 1 ml *tert*-Butylmethylether wurden 51 μ l Hexanal (0,50 mmol) und nach 5 Minuten 274 μ l Nitromethan (5,00 mmol) zugegeben. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden wurde (*S*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 27 % erhalten.

Beispiel 19:

Zu 100 μ l einer Lösung von (*S*)-Hydroxynitrillyase aus *Manihot esculenta* (6696 IU/ml + 900 μ l 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) und 1 mL *tert*-Butylmethylether wurden 51 μ L Benzaldehyd (0,50 mmol) und nach 5 Minuten 372 μ L Nitroethan (5,00 mmol) zugegeben.



Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden wurde 2-Nitro-1-phenylpropanol als Diastereomerengemisch erhalten.

$ee_{erythro}$ 89 %

ee_{threo} 4 %

Beispiel 20:

100 μ l Benzaldehyd (0,98 mmol) wurden in 2 ml *tert*-Butylmethylether gelöst und mit 1 ml einer Lösung von rekombinanter (*R*)-Hydroxynitrillyase aus *Prunus amygdalus* (5150 IU/ml, aus *Pichia pastoris*, + 1 ml 50 mM K_2HPO_4 / Citrat-Puffer pH 3,4) versetzt. Nach 5 Minuten wurden 530 μ l Nitromethan (9,86 mmol) zugegeben und die Emulsion wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 7 Tagen wurde (*R*)-2-Nitro-1-phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 10 % erhalten.

Beispiel 21:

Herstellung von 2-Amino-1-phenylethanol

0,78 g 2-Nitro-1-phenylethanol (4,96 mmol) wurden in 10 ml Methanol vorgelegt und mit Pd / C 10% (3,4 mol% Pd) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde 3-mal evakuiert und mit Wasserstoff gespült. Anschließend wurde die Reaktion unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Stunden wurde belüftet und über Celite™ filtriert. Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographische Reinigung ergab 2-Amino-1-phenylethanol als einheitliche Substanz (577 mg farbloses Öl, 92 % isolierte Ausbeute).

1H -NMR: δ (ppm) = 2.15 – 2.50 (br. s, 3H), 2.79 (dd, $J=13$ Hz, $J=8$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J=13$ Hz, $J=4$ Hz, 1H), 4.62 (dd, $J=8$ Hz, $J=4$ Hz, 1H), 7.25-7.40 (m, 5H)

^{13}C -NMR: δ (ppm) = 49.5, 74.5, 126.1, 127.8, 128.6, 142.8

Beispiel 22:

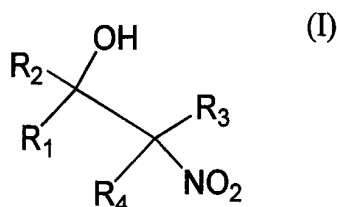
Herstellung von 2-Amino-1-phenylpropanol

3,00 g 2-Nitro-1-phenylpropanol (16,56 mmol) wurden in 65 ml Ethanol vorgelegt und mit Pd / C 10% (10 mol% Pd) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde 3-mal evakuiert und mit Wasserstoff gespült. Anschließend wurde die Reaktion unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 22 Stunden wurde belüftet und über Celite™ filtriert. Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographische Reinigung ergab 2-Amino-1-phenylpropanol als einheitliche Substanz (2,24 g gelbes Öl, 90 % isolierte

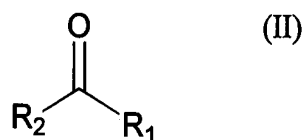
Ausbeute). Die NMR-Analyse war identisch mit jener der käuflichen Referenzsubstanz bzw. mit Literaturdaten (J. Org. Chem. 2002, 67, 2101 - 2110; Tetrahedron: Asymmetry 1999, 10, 3263 - 3266).

Patentansprüche:

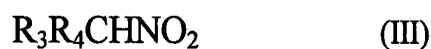
1. Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I)



in der R_1 und R_2 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituierten C_1 - C_{20} -Alkyl-, C_6 - C_{14} -Aryl-, C_1 - C_{14} -Heteroarylrest, sowie Kombinationen davon oder gemeinsam einen gegebenenfalls substituierten C_3 - C_8 -Cycloalkylrest, der ein oder mehrere Heteroatome im Rest enthalten kann, bedeuten, oder einer der Reste Wasserstoff bedeutet, und R_3 und R_4 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls substituierten C_1 - C_{20} -Alkylrest, der gegebenenfalls zusätzlich einen substituierten oder nicht-substituierten C_6 - C_{14} -Aryl- oder C_1 - C_{14} -Heteroarylrest trägt, oder Wasserstoff bedeuten, wobei ein Aldehyd oder ein Keton der Formel (II)



in der R_1 und R_2 wie oben definiert sind, mit einem Nitroalkan der Formel (III)

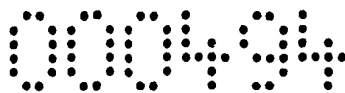


in der R_3 und R_4 wie oben definiert sind, zu den entsprechenden β -Hydroxynitroverbindungen der Formel(I) umgesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in Gegenwart einer Hydroxynitrillyase durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis*, *Prunus amygdalus* oder *Manihot esculenta* stammt, und/oder eine rekombinante Hydroxynitrillyase aus *Pichia pastoris* ist.

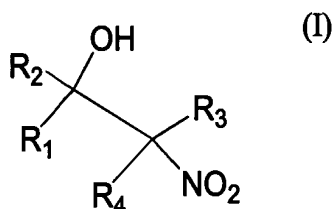
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur von 0°C bis 20°C , vorzugsweise bei Raumtemperatur, durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in einem organischen Lösungsmittel, einem wässrigen Puffer, einem Zweiphasensystem oder in Emulsion durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Verbindung der Formel (II) ein gegebenenfalls substituierter Benzaldehyd und als Nitroalkan der Formel (III) Nitromethan oder Nitroethan eingesetzt werden.
6. Verfahren zur Herstellung von Aminoalkoholen, dadurch gekennzeichnet, dass entsprechende β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I) gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 hergestellt und anschließend reduziert werden.

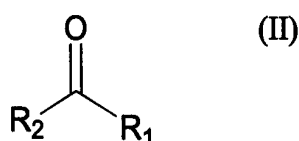


Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I)



in der R_1 und R_2 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituierten C_1 - C_{20} -Alkyl-, oder C_6 - C_{14} -Arylrest, einen Heteroarylrest aus der Gruppe Pyrrolyl, Furyl, Thienyl oder Pyridyl, sowie Kombinationen davon bedeuten, oder einer der Reste Wasserstoff bedeutet, und R_3 und R_4 unabhängig voneinander einen gegebenenfalls substituierten C_1 - C_{20} -Alkylrest oder Wasserstoff bedeuten, wobei ein Aldehyd oder ein Keton der Formel (II)

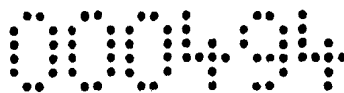


in der R_1 und R_2 wie oben definiert sind, mit einem Nitroalkan der Formel (III)

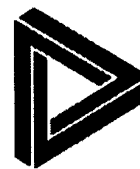


in der R_3 und R_4 wie oben definiert sind, zu den entsprechenden β -Hydroxynitroverbindungen der Formel(I) umgesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in Gegenwart einer Hydroxynitrillyase durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis*, *Prunus amygdalus* oder *Manihot esculenta* stammt, und/oder eine rekombinante Hydroxynitrillyase aus *Pichia pastoris* ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur von 0°C bis 20°C , vorzugsweise bei Raumtemperatur, durchgeführt wird.



4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in einem organischen Lösungsmittel, einem wässrigen Puffer, einem Zweiphasensystem oder in Emulsion durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Verbindung der Formel (II) ein gegebenenfalls substituierter Benzaldehyd und als Nitroalkan der Formel (III) Nitromethan oder Nitroethan eingesetzt werden.
6. Verfahren zur Herstellung von Aminoalkoholen, dadurch gekennzeichnet, dass entsprechende β -Hydroxynitroverbindungen der Formel (I) gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 hergestellt und anschließend mittels Hydrierung in Gegenwart von Pd/C, Raney Nickel, PtO₂, NaBH₄, LiAlH₄ oder Säure/Metall zu den korrespondierenden Aminoalkoholen reduziert werden.



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC⁸:
C07C 201/12 (2006.01); C12P 13/00 (2006.01)

Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):
C07C, C12P

Konsultierte Online-Datenbank:
WPI, EPODOC, PAJ, REGISTRY, CAPLUS

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am **30. Jänner 2004** eingereichten Ansprüchen **1-6** erstellt.

Kategorie ⁷	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	EP0969095 A2 (DSM FINE CHEM AUSTRIA GMBH) 5. Jänner 2000 (05.01.2000) <i>Absatz [0009] bis [0011]</i> --	1-6
A	EP0947498 A1 (CHISSO CORP) 6. Oktober 1999 (06.10.1999) <i>Zusammenfassung, Anspruch 14</i> ----	1-6

Datum der Beendigung der Recherche:
7. Februar 2006

☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):
Dr. MÜLLER-HIEL

⁷Kategorien der angeführten Dokumente:

- X** Veröffentlichung von **besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y** Veröffentlichung von **Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand 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 **nahellegend** 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.