(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 159**

(51) Int. Cl.:
C12P 7/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06762851 .1**
(96) Fecha de presentación : **27.07.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1926821**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

(54) Título: **Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos.**

(30) Prioridad: **23.09.2005 AT A 1570/2005**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **23.09.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **23.09.2011**

(73) Titular/es: **IEP GmbH**
Rheingaustrasse 190-196
65203 Wiesbaden, DE

(72) Inventor/es: **Gupta, Antje;**
Tschentscher, Anke y
Bobkova, Maria

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 365 159 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos con carbonil reductasas.

Las carbonil reductasas (otros nombres: alcohol deshidrogenasas, oxidorreductasas) se conocen como catalizadores para la reducción de compuestos carbonílicos o para la oxidación de alcoholes secundarios. Estas enzimas necesitan una coenzima, por ejemplo NAD(P)H. La reducción de cetonas con la carbonil reductasa obtenida a partir de *Lactobacillus kefir* y la coenzima NADPH se conoce por ejemplo por el documento US 5.342.767. Con estas enzimas se logra reducir cetocompuestos dando hidroxicompuestos ópticamente activos. Un procedimiento adicional se conoce por ejemplo por el documento WO 03/078615.

Los hidroxicompuestos ópticamente activos son elementos estructurales quirales valiosos con amplia aplicación para la síntesis de compuestos farmacológicamente eficaces, sustancias aromáticas, feromonas, productos agroquímicos e inhibidores enzimáticos. A este respecto, en particular en la industria farmacéutica existe una demanda creciente de compuestos quirales y por consiguiente de registrar tecnologías de síntesis quiral, dado que en el futuro apenas se usarán compuestos racémicos como fármacos.

La reducción asimétrica de cetocompuestos proquirales es un sector de la catálisis estereoselectiva al representar la biocatálisis una tecnología de competencia eficaz para la catálisis química. La hidrogenación asimétrica química requiere la utilización de catalizadores de metales pesados altamente tóxicos y contaminantes, de condiciones de reacción extremas y por consiguiente de alta energía así como grandes cantidades de disolventes orgánicos. Además, estos procedimientos se caracterizan con frecuencia por reacciones secundarias y excesos enantioméricos insuficientes.

Las reducciones de cetocompuestos proquirales para dar hidroxicompuestos y a la inversa se producen en la naturaleza en numerosas rutas bioquímicas, tanto en el metabolismo primario como en el metabolismo secundario, en cada organismo y se catalizan por diferentes tipos de oxidorreductasas y alcohol secundario deshidrogenasas. Por regla general, estas enzimas dependen del cofactor.

La principal factibilidad de la utilización de biocatalizadores para la reducción de cetocompuestos proquirales para dar hidroxicompuestos quirales se demostró en el pasado repetidas veces por medio de sistemas de modelización, en los que se trabajó tanto con oxidorreductasas aisladas como con diferentes sistemas de biotransformación de células completas. El planteamiento biocatalítico es ventajoso en cuanto a las condiciones de reacción suaves, la ausencia de productos secundarios y con frecuencia excesos enantioméricos alcanzables esencialmente mejores. A este respecto, el uso de enzimas aisladas lleva ventaja con respecto al procedimiento con células completas en cuanto al exceso enantiomérico alcanzable, a la generación de productos secundarios y de degradación así como en cuanto al aislamiento de los productos. Además, el uso de procesos de células completas no es posible en todas las operaciones químicas, dado que para ello son necesarios equipamiento y conocimientos especiales.

Recientemente pudo mostrarse que el uso de oxidorreductasas aisladas en sistemas bifásicos acuosos/orgánicos con disolventes orgánicos es posible de manera extraordinariamente eficaz y también a altas concentraciones (>5%). En el caso de los sistemas descritos, a este respecto, el cetocompuesto que debe reducirse, la mayoría de las veces escasamente soluble en agua, forma la fase orgánica junto con el disolvente orgánico. También puede renunciarse en parte al propio disolvente orgánico, entonces la fase orgánica se forma a partir del cetocompuesto que debe reducirse (documentos DE10119274, DE10327454.4, DE 103 37 401.9, DE 103 00 335.5). La regeneración de coenzima se realiza a este respecto mediante la oxidación simultánea de alcoholes secundarios, usándose en la mayoría de los casos el barato 2-propanol miscible con agua.

Ejemplos de deshidrogenasas y oxidorreductasas específicas de R y S adecuadas de alta enantioselectividad son:

Carbonil reductasa de *Candida parapsilosis* (CPCR) (documentos US 5.523.223 y US 5.763.236, (Enzyme Microb Technol. noviembre de 1993; 15(11):950-8)) o ADH de *Pichia capsulata* (documento DE10327454.4);

Carbonil reductasa de *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (documento US 5.523.223), *Norcardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10) (1999), páginas 1721-1729), (Appl Microbiol Biotechnol. septiembre de 2003; 62(4):380-6. Publicación electrónica del 26 de abril de 2003) y *Rhodococcus ruber* (J Org Chem. 24 de enero de 2003; 68(2):402-6.);

y

alcohol secundario deshidrogenasas específicas de R de organismos del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus kefir* (documento US5200335), *Lactobacillus brevis* (documento DE 19610984 A1) (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. diciembre de 2000; 56 Pt 12: 1696-8), *Lactobacillus minor* (documento DE10119274) o *Pseudomonas* (documento US 05385833) (Appl Microbiol Biotechnol. agosto de 2002; 59(4-5):483-7. Publicación electrónica del 26 de junio de 2002. J. Org. Chem. 1992, 57, 1532).

El documento WO 2005/108593 A describe un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de 2-butanona para dar el correspondiente hidroxicompuesto quiral, haciéndose reaccionar el cetocompuesto en una mezcla líquida, bifásica, que contiene 2-butanona, 4-metil-2-pentanol o 2-heptanol y agua, con una oxidorreductasa de *Candida parapsilosis* en presencia de NAD como cofactor.

En el documento WO 03/078615 A se describen alcohol deshidrogenasas así como un procedimiento de reducción enzimática enantioselectiva de cetocompuestos con el uso de estas enzimas, en el que se realiza la reducción con una oxidorreductasa en presencia de por ejemplo NADH. Como cosustrato se utilizan alcoholes secundarios tales como isopropanol o 4-metil-2-propanol.

En los procedimientos del estado de la técnica existe la necesidad de mejorar o simplificar la regeneración de coenzima. La mayoría de las alcohol deshidrogenasas y oxidorreductasas se inactivan rápidamente a una concentración de propanol de >15% en volumen, lo que conduce a que éste no pueda utilizarse en procedimientos discontinuos en cualquier exceso para dar un cetocompuesto, por lo cual a igual concentración de cetocompuesto en el caso de sustratos con una posición de equilibrio desfavorable, sólo pueden alcanzarse rendimientos poco satisfactorios.

La invención se plantea el objetivo de eliminar este inconveniente.

El procedimiento según la invención para la reducción enzimática enantioselectiva de

a) cetocompuestos de fórmula general I

$$R_1\text{-}C(O)\text{-}R_2 \qquad (I)$$

en la que R_1 significa uno de los restos

1) -alquilo (C_3-C_{20}), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,

2) -alquenilo (C_2-C_{20}), en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente hasta cuatro dobles enlaces,

3) -alquinilo (C_2-C_{20}), en el que el alquinilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente hasta cuatro triples enlaces,

4) -arilo (C_6-C_{14}),

5) -alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}),

6) -heterociclo (C_5-C_{14}), que no está sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$, o

7) -cicloalquilo (C_3-C_7),

no estando sustituidos los restos mencionados anteriormente en 1) a 7) o estando mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

y R_2 significa uno de los restos

8) -alquilo (C_1-C_6), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,

9) -alquenilo (C_2-C_6), en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente hasta tres dobles enlaces,

10) -alquinilo (C_2-C_6), en el que el alquinilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente dos triples enlaces, o

11) -alquil (C_1-C_{10})-C(O)-O-alquilo (C_1-C_6), en el que el alquilo es lineal o de cadena ramificada y no está sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

no estando sustituidos los restos mencionados anteriormente en 8) a 11) o estando mono, di o trisustituidos con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

b) de los cetocompuestos 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, 4-hidroxi-2-butanona, piruvato de etilo, fenilglioxilato de etilo, 1,4-dicloro-2-butanona, 4-bromoacetoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona, 1,1,1-trifluoroacetona, 1-cloroacetona o 2,5-hexanodiona

caracterizado porque una mezcla líquida, bifásica, que contiene

(a) al menos el 5% en peso/volumen de un compuesto de fórmula (I),

(b) al menos el 10% en volumen de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol y

(c) agua,

se trata con una oxidorreductasa en presencia de NAD(P)H como cofactor, para formar, para el caso (a), un hidroxicompuesto quiral de fórmula general II

$$R_1\text{-CH(OH)-}R_2 \qquad \text{(II)},$$

en la que R_1 y R_2 tienen los significados indicados anteriormente, y para formar, en el caso (b), un hidroxicompuesto quiral correspondiente.

La invención se basa en el conocimiento de que los procedimientos que usan las alcohol deshidrogenasas y oxidorreductasas aisladas, de alta expresión, mediante la utilización de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol no miscible con agua para la regeneración de coenzima del NAD(P)H, pueden mejorarse o simplificarse de manera decisiva.

Variantes preferidas del procedimiento según la invención se caracterizan porque la mezcla líquida, bifásica, en el caso del uso de una oxidorreductasa de origen microbiano contiene al menos el 40% en volumen, en particular entre el 40 y el 80% en volumen de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol, con respecto al volumen total de la mezcla básica de reacción.

Por consiguiente, en el procedimiento según la invención se realiza la reducción del cetocompuesto en un sistema bifásico que consiste en una fase acuosa, que contiene el cofactor NADH o NADPH y la oxidorreductasa, y una fase orgánica, formada por el cosustrato 4-metil-2-pentanol y por el cetocompuesto disuelto en la misma en su mayor parte.

La regeneración de coenzima de NAD(P)H tiene lugar a este respecto mediante la oxidación del cosustrato 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol, que sirve simultáneamente como disolvente y agente de extracción, en particular para cetocompuestos escasamente solubles en agua.

Mediante la utilización de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol como disolvente y cosustrato pueden realizarse también para sustratos con una posición de equilibrio desfavorable buenos rendimientos (>90%), altas concentraciones, así como tiempos de reacción considerablemente más cortos.

El procedimiento descrito es también especialmente ventajoso para la reducción de cetonas con bajos puntos de ebullición, tales como por ejemplo 1,1,1-trifluoroacetona, y similares, en las que el punto de ebullición de los alcoholes quirales resultantes, tal como en el caso de 1,1,1-trifluoropropan-2-ol se encuentra por debajo del del agua. En estos casos se dificulta con frecuencia la separación de hidroxicompuestos, acetona, 2-propanol y agua por medio de destilación.

Además, los alcoholes utilizados según la invención han resultado ser estabilizadores para muchas oxidorreductasas utilizadas, lo que en general conduce a un consumo enzimático reducido en comparación con otros sistemas bifásicos acuosos-orgánicos.

A este respecto, la regeneración de coenzima puede tener lugar de manera acoplada con sustrato (es decir, una enzima para la reducción del cetosustrato y para la oxidación del 4-metil-2-pentanol) o de manera acoplada con enzima. En el planteamiento acoplado con enzima, la regeneración del cofactor NADH o NADPH tiene lugar con ayuda de una segunda alcohol secundario deshidrogenasa aislada de alta expresión.

Con este método se alcanzan ttn (*total turn over number* (número de recambio total), moles de producto formado por mol de cofactor) que se encuentran en el intervalo de 10^3 - 10^6. Las concentraciones de sustrato realizables se encuentran a este respecto en su mayor parte muy por encima del 5% (porcentaje en volumen).

La concentración del cosustrato se encuentra a este respecto en el intervalo de desde el 10% hasta el 90% en volumen de la mezcla de reacción, preferiblemente entre el 40 y el 80% en volumen.

El consumo enzimático de la oxidorreductasa se encuentra en el intervalo de 10000 - 10 mill. de U/kg (sin límite superior) de cetocompuesto que va a hacerse reaccionar. La unidad enzimática 1 U corresponde a este respecto a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar 1 μmol del compuesto de fórmula I por minuto (min.).

Por el término “NADH” se entiende nicotinamida adenina dinucleótido reducido. Por el término “NAD” se entiende nicotinamida adenina dinucleótido. Por el término “NADPH” se entiende nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido. Por el término “NADP” se entiende nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Por la expresión “hidroxicompuesto” quiral se entienden por ejemplo compuestos de fórmula II

$$R_1\text{-C(OH)-}R_2 \qquad \text{(II)},$$

en la que R_1 y R_2 tienen el mismo significado que en la fórmula I.

Por el término arilo se entienden restos de hidrocarburo aromático con de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo. Restos -arilo (C_6-C_{14}) son por ejemplo fenilo, naftilo, por ejemplo 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, por ejemplo 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antrilo o fluorenilo. Restos bifenililo, restos naftilo y en particular restos fenilo son restos arilo preferidos. Por el término "halógeno" se entiende un elemento de la serie flúor, cloro, bromo o yodo. Por la expresión "-alquilo (C_1-C_{20})" se entiende un resto de hidrocarburo cuya cadena carbonada es lineal o ramificada y contiene de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonenilo o decanilo. Por la expresión "-cicloalquilo (C_3-C_7)" se entienden restos de hidrocarburo cíclico tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. La expresión "-heterociclo (C_5-C_{14})" significa un anillo monocíclico, bicíclico o heterocíclico de 5 a 14 miembros, que está parcialmente saturado o completamente saturado. Ejemplos de heteroátomos son N, O y S. Ejemplos de la expresión -heterociclo (C_5-C_{14}) son restos que se derivan de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxidos, triazolonas, oxadiazolonas, isoxazolonas, oxadiazolidindionas, triazoles, que están sustituidos con F, -CN, $-CF_3$ o -C(O)-O-alquilo (C_1-C_4), 3-hidroxipirro-2,4-dionas, 5-oxo-1,2,4-tiadiazoles, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, carbolina y derivados benzocondensados, ciclopenta, ciclohexa o cicloheptacondensados de estos heterociclos. En particular se prefieren los restos 2- o 3-pirrolilo, fenilpirrolilo tales como 4- o 5-fenil-2-pirrolilo, 2-furilo, 2-tienilo, 4-imidazolilo, metil-imidazolilo, por ejemplo 1-metil-2-, -4- o -5-imidazolilo, 1,3-tiazol-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-, 3- o 4-piridil-N-óxido, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 2-, 3- o 5-indolilo, 2-indolilo sustituido, por ejemplo 1-metil-, 5-metil-, 5-metoxi-, 5-benciloxi-, 5-cloro- o 4,5-dimetil-2-indolilo, 1-bencil-2- o -3-indolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-2-indolilo, ciclohepta[b]-5-pirrolilo, 2-, 3- o 4-quinolilo, 1-, 3- o 4-isoquinolilo, 1-oxo-1,2-dihidro-3-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 2-benzofuranilo, 2-benzo-tienilo, 2-benzoxazolilo o benzotiazolilo o dihidropiridinilo, pirrolidinilo, por ejemplo 2- o 3-(N-metilpirrolidinilo), piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrotienilo o benzodioxolanilo.

Cetocompuestos preferidos son 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, ácido etil-8-cloro-6-oxooctanoico, 3-oxovalerato de etilo, 4-hidroxi-2-butanona, 2-oxovalerato de etilo, ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico, piruvato de etilo, fenilglioxilato de etilo, 1-fenil-2-propanona, 2,3-dicloroacetofenona, acetofenona, 2-octanona, 3-octanona, 2,5-hexanodiona, 1,4-dicloro-2-butanona, cloruro de fenacilo, 4-bromoacetoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona, 1,1,1-trifluoroacetona y 1-cloroacetona.

En el procedimiento según la invención, la enzima puede utilizarse o bien completamente purificada, o bien parcialmente purificada, o contenida en células. A este respecto, las células utilizadas pueden encontrarse en estado nativo, permeabilizadas o lisadas.

Por kg de compuesto de fórmula I que va a hacerse reaccionar se utilizan de 10000 a 10 mill. de U de oxidorreductasa (sin límite superior). A este respecto, la unidad enzimática 1 U corresponde a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar 1 μmol del compuesto de fórmula I por minuto (min.).

Además de la oxidorreductasa para la cetorreducción enantioselectiva puede estar contenida otra oxidorreductasa adicional, preferiblemente una alcohol secundario deshidrogenasa, para la regeneración de coenzima. Alcohol secundario deshidrogenasas adecuadas son por ejemplo aquéllas que proceden de *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium beijerinckii*, *Lactobacillus minor* o *Lactobacillus brevis*, *Pichia capsulata*, *Candida parapsilosis*, *Rhodococcus erythropolis*.

La alcohol deshidrogenasa puede utilizarse en el procedimiento según la invención o bien completamente purificada o bien parcialmente purificada o pueden usarse células completas que contienen la alcohol deshidrogenasa. A este respecto, las células utilizadas pueden encontrarse en estado nativo, permeabilizadas o lisadas.

Al agua puede añadírsele un tampón, por ejemplo tampón fosfato de potasio, Tris/HCl o trietanolamina con un valor de pH de desde 5 hasta 10, preferiblemente un valor de pH de desde 6 hasta 9. El tampón puede contener adicionalmente iones para la estabilización o activación de ambas enzimas, por ejemplo iones magnesio para la estabilización de la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus minor*.

El sustrato puede ser sólido o líquido, soluble en agua o insoluble en agua. Además, durante la reacción el sustrato puede encontrarse completamente disuelto o también no completamente disuelto. La mezcla básica de reacción puede contener un disolvente orgánico adicional. Los disolventes orgánicos preferidos son por ejemplo acetato de etilo, terc-butilmetil éter, diisopropil éter, heptano, hexano o ciclohexano o sus mezclas de diferente composición.

La concentración del cofactor NAD(P)H con respecto a la fase acuosa asciende a desde 0,001 mM hasta 1 mM, en particular desde 0,01 mM hasta 0,1 mM.

Los compuestos de fórmula I se utilizan en el procedimiento según la invención por ejemplo en una cantidad del 2% - 50% (p/v) con respecto al volumen total, preferiblemente desde el 10% hasta el 30% (p/v).

El procedimiento según la invención se realiza por ejemplo en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o de metal. Para ello se transfieren los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo una atmósfera por ejemplo de nitrógeno o aire. Según el sustrato y el compuesto de fórmula I utilizado, el tiempo de reacción

asciende a desde 1 hora hasta 96 horas, en particular desde 2 horas hasta 24 horas.

A la inversa, el procedimiento según la invención puede aplicarse también para la reacción de oxidación catalizada por enzimas. Las condiciones de reacción son esencialmente las mismas que en el procedimiento mencionado anteriormente para la reducción enantioespecífica del cetocompuesto de fórmula I. Sin embargo, en el procedimiento en lugar de una reducción enantioselectiva del cetocompuesto de fórmula I, se oxida el hidroxicompuesto correspondiente de fórmula II para dar el cetocompuesto correspondiente. Además, en el procedimiento en vez de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol o 5-metil-3-heptanol se utilizan las baratas cetonas correspondientes 4-metil-2-pentanona, 5-metil-2-hexanona o 5 metil-3-heptanona para la regeneración de NAD(P). A este respecto, con el uso de un hidroxicompuesto racémico de fórmula II junto con una oxidorreductasa enantioselectiva se obtiene el cetocompuesto de fórmula I y un enantiómero del hidroxicompuesto racémico de fórmula II.

Sin embargo, el procedimiento también puede aplicarse para la preparación de cetocompuestos difícilmente accesibles a partir de sus alcoholes racémicos utilizándose oxidorreductasas no selectivas o también mezclas de oxidorreductasas enantioselectivas.

La invención se explica en detalle a continuación por medio de ejemplos.

Ejemplos

Se realiza la reducción de los compuestos de fórmula 1 transfiriendo los componentes indicados a continuación a un recipiente de reacción e incubando con un mezclado intenso y a temperatura ambiente.

1. *Síntesis de ácido (R)-etil-4-cloro-3-hidroxibutírico con enzima dependiente de NADH de Candida parapsilosis*

Componente	Cantidad	Porcentaje	Concentración
Tampón tampón trietanolamina 100 mM pH = 7,5; $ZnCl_2$ 2 mM glicerina al 10%	1 ml		
NAD [M = 663 g/mol]	2 mg	3 μmoles	0,3 mM
4-Metil-2-pentanol	7 ml		
4-Cloroacetoacetato de etilo (164 g/mol, d= 1,2 g/ml)	2 ml = 2,4 g	20% (v/v) 14,6 mmoles	
Enzima = S-ADH de *Candida parapsilosis*	1200 U		
Volumen	10 ml		
Sistema	bifásico		
Regeneración de coenzima	acoplada a sustrato		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	>99%		
Valor ee	>99%		
ttn de NAD	4866		
Consumo enzimático	500 U/g		

Tras finalizar la reacción se separa la fase acuosa de la fase orgánica que contiene el producto y se purifica el producto (R)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo por medio de destilación del 4-metil-2-pentanol. De este modo puede obtenerse el (R)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo con elevada pureza química y óptica.

2. *Síntesis de S,S-butanodiol con enzima dependiente de NADH de Candida parapsilosis*

Componente	Cantidad	Porcentaje	Concentración
Tampón tampón trietanolamina 100 mM pH = 7,5; $ZnCl_2$ 2 mM, glicerina al 10%	1 ml		
NAD [M = 663 g/mol]	1 mg	1,5 μmoles	0,15 mM

4-Metil-2-pentanol	8 ml		
4-Hidroxi-2-butanona (M =88,12 g/mol)	1 ml	10% (v/v)	
Enzima = S-ADH de *Candida parapsilosis*	1000 U		
Volumen	10 ml		
Sistema	bifásico		
Regeneración de coenzima	acoplada a sustrato		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	>90		
Valor ee	>99%		
ttn de NAD	6630		
Consumo enzimático	500 U/g		

Tras finalizar la reacción se separa la fase acuosa de la fase orgánica que contiene el producto y se purifica el producto (S,S)-butanodiol por medio de destilación del 4-metil-2-pentanol. De este modo puede obtenerse el (S,S)-butanodiol con elevada pureza química y óptica.

3. *Síntesis de 2,5-S,S-hexanodiol con enzima dependiente de NADH de Candida parapsilosis*

Componente	Cantidad	Porcentaje	Concentración
Tampón tampón trietanolamina 100 mM pH = 7,5	100 ml		
NAD [M = 663 g/mol]	100 mg	= 0,15 mmoles	
4-Metil-2-pentanol	800 ml		
2,5-Hexanodiona (114 g/mol, d= 1)	100 ml =0,87 moles	10% (v/v)	
Enzima = S-ADH de *Candida parapsilosis*	36000 U		
Volumen	1 l		
Sistema	bifásico		
Regeneración de coenzima	acoplada a sustrato		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	67%		
Valor ee	>99,9		
ttn de NAD	5800		
Consumo enzimático	360 U/g		

Tras finalizar la reacción se separa la fase acuosa de la fase orgánica que contiene el producto y se separa la mezcla de producto/educto 2,5-(S,S)-hexanodiol/2,5-hexanodiona por medio de destilación del 4-metil-2-pentanol. El producto 2,5-(S,S)-hexanodiol puede separarse en una destilación a vacío posterior del educto 2,5-hexanodiona y obtenerse con una pureza química >99%. A este respecto, el rendimiento total del procedimiento asciende por ejemplo al 40-60%.

4. *Síntesis de (R)-2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ol con enzima dependiente de NADH de Pichia capsulata*

Componente	Cantidad	Porcentaje	Concentración
Tampón trietanolamina 100 mM pH = 7; $ZnCl_2$ 2 mM, glicerina al 10%	1 ml		
NAD [M = 663 g/mol]	0,5 mg	0,75 μmoles	
4-Metil-2-pentanol	8 ml		
2-Cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona (M =189 g/mol)	1 g	5,2 mmoles	
Enzima = S-ADH de *Pichia capsulata* (documento DE 10327454.4)	1000 U		
Volumen	10 ml		
Sistema	bifásico		
Regeneración de coenzima	acoplada a sustrato		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	>99%		
Valor ee	>99%		
ttn de NAD	6900		
Consumo enzimático	1000 U/g		

Tras finalizar la reacción se separa la fase acuosa de la fase orgánica que contiene el producto y se separa el producto 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ol por medio de destilación del 4-metil-2-pentanol.

5. *Reducción de éster etílico del ácido 8-cloro-6-oxooctanoico para dar éster etílico del ácido S-8-cloro-6-hidroxioctanoico por medio de oxidorreductasa dependiente de NADPH*

Componente	Cantidad	Porcentaje	Concentración
Tampón fosfato de potasio 100 mM pH = 8,5, glicerina al 10%	2 ml		
NADP [M = 765 g/mol]	0,1 mg	0,13 μmoles	
4-Metil-2-pentanol	5 ml		
Éster etílico del ácido S-8-cloro-6-oxo-octanoico, 222,71 g/mol	0,5 ml	2,2 mmoles	
Enzima = oxidorreductasa de *Lactobacillus reuteri* (documento DE 103 00 335.5)	240 U		
Enzima ADH de *Thermoanerobium brockii*	240 U		
Volumen	8 ml		
Sistema	bifásico		
Regeneración de coenzima	acoplada a enzima		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	90%		
Valor ee	97%		
ttn de NADP	17000		

Consumo enzimático *Lactobacillus reuteri*	480 U/g		
Consumo enzimático *Thermoanerobium brockii*	480 U/g		

6. *Reducción de éster metílico del ácido 3-oxovalérico para dar éster metílico del ácido S-3-hidroxi-oxovalérico de Pichia capsulata*

Componente	Cantidad	Porcentaje	Concentración
Tampón tampón trietanolamina 100 mM pH = 7,0 glicerina al 10%	450 µl		
NAD [M = 663 g/mol]	0,1 mg		
4-Metil-2-pentanol	450 µl		
3-Oxovalerato de metilo	100 µl		
Enzima = S-ADH de *Pichia capsulata* (documento DE 10327454.4)	50 U		
Volumen	1000 µl		
Sistema	bifásico		
Regeneración de coenzima	acoplada a sustrato		
Tiempo de incubación	24 h		
Rendimiento	95%		
Valor ee	>99%		
ttn de NAD	5300		
Consumo enzimático	500 U/g		

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva

a) de cetocompuestos de fórmula general I

$$R_1\text{-}C(O)\text{-}R_2 \qquad (I)$$

en la que R_1 significa uno de los restos

1) -alquilo (C_3-C_{20}), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,

2) -alquenilo (C_2-C_{20}), en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente hasta cuatro dobles enlaces,

3) -alquinilo (C_2-C_{20}), en el que el alquinilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente hasta cuatro triples enlaces,

4) -arilo (C_6-C_{14}),

5) -alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}),

6) -heterociclo (C_5-C_{14}), que no está sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$, o

7) -cicloalquilo (C_3-C_7),

no estando sustituidos los restos mencionados anteriormente en 1) a 7) o estando mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

y R_2 significa uno de los restos

8) -alquilo (C_1-C_6), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,

9) -alquenilo (C_2-C_6), en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente hasta tres dobles enlaces,

10) -alquinilo (C_2-C_6), en el que el alquinilo es de cadena lineal o ramificada y contiene opcionalmente dos triples enlaces, o

11) -alquil (C_1-C_{10})-C(O)-O-alquilo (C_1-C_6), en el que el alquilo es lineal o de cadena ramificada y no está sustituido o está mono, di o trisustituido con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

no estando sustituidos los restos mencionados anteriormente en 8) a 11) o estando mono, di o trisustituidos independientemente entre sí con -OH, halógeno, $-NO_2$ y/o $-NH_2$,

b) de los cetocompuestos 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, 4-hidroxi-2-butanona, piruvato de etilo, fenilglioxilato de etilo, 1,4-dicloro-2-butanona, 4-bromoacetoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona, 1,1,1-trifluoroacetona, 1-cloroacetona o 2,5-hexanodiona

caracterizado porque una mezcla líquida, bifásica, que contiene

(a) al menos el 5% en peso/volumen de uno de los cetocompuestos mencionados anteriormente,

(b) al menos el 10% en volumen de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol y

(c) agua,

se trata con una oxidorreductasa en presencia de NAD(P)H como cofactor, para formar, para el caso (a), un hidroxicompuesto quiral de fórmula general II

$$R_1\text{-}CH(OH)\text{-}R_2 \qquad (II),$$

en la que R_1 y R_2 tienen los significados indicados anteriormente, y para formar, en el caso (b), un hidroxicompuesto quiral correspondiente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la oxidorreductasa es de origen microbiano.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la oxidorreductasa procede de bacterias del grupo *Lactobacillales* o de levaduras.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la oxidorreductasa procede de bacterias del género *Lactobacillus* o de levaduras de los géneros *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*, *Debaromyces* o *Issatchenkia*.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la mezcla líquida, bifásica, en el caso del uso de una oxidorreductasa de origen microbiano, contiene al menos el 40% en volumen de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la mezcla líquida, bifásica, contiene entre el 40 y el 80% en volumen de 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y/o 2-heptanol.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la mezcla líquida, bifásica, contiene uno de los cetocompuestos mencionados anteriormente entre el 2 y el 50% en peso/volumen.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la mezcla líquida, bifásica, contiene uno de los cetocompuestos mencionados anteriormente entre el 10 y el 50% en peso/volumen.