

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 345**

51 Int. Cl.:
C12P 13/00 (2006.01)
C07K 14/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06750625 .3**
96 Fecha de presentación: **19.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1893765**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN (2R,3S)-1,2-EPOXI-3-(PROTEGIDO)AMINO-4-BUTANO SUSTITUIDO E INTERMEDIOS DEL MISMO.**

30 Prioridad:
25.05.2005 US 684300 P
01.03.2006 US 365275

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.03.2012

73 Titular/es:
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD
PRINCETON NJ 08543-4000, US

72 Inventor/es:
BOWERS, Nigel, Ian;
SKONEZNY, Paul, M.;
STEIN, Gregory, L.;
FRANCESCHINI, Thomas;
CHIANG, Shu-Jen;
ANDERSON, Wendy, L.;
YOU, Li y
XING, Zizhuo

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 345 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 de preparación (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido e intermedios del mismo

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica los beneficios de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/684.300, presentada el 25 de mayo de 2005.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido e intermedios del mismo. Más específicamente, la invención se refiere al uso de una cepa de *Rhodococcus erythropolis* mutagenizada que tiene número de depósito ATCC PTA-6648 para reducir microbiológicamente (3S)-1-halo-2-oxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido a (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido. La presente invención también se refiere a la conversión de (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido en (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido y al aislamiento de cristales de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido.

Antecedentes de la invención

15 Los 1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butanos sustituidos representados por la siguiente fórmula general:



en la que X es un halógeno, R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, y arilo sustituido, y R₁ representa un grupo protector de amino, son útiles en la producción de derivados de butano 1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-sustituido representados por la siguiente fórmula general:



20 en la que R y R₁ son como se han definido anteriormente. Los butanos 1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-sustituido de fórmula 1 pueden prepararse reduciendo microbiológicamente un sustrato de (3S)-1-halo-2-oxo-3-(protegido)amino-4-sustituido sustituido que tiene la siguiente fórmula general:

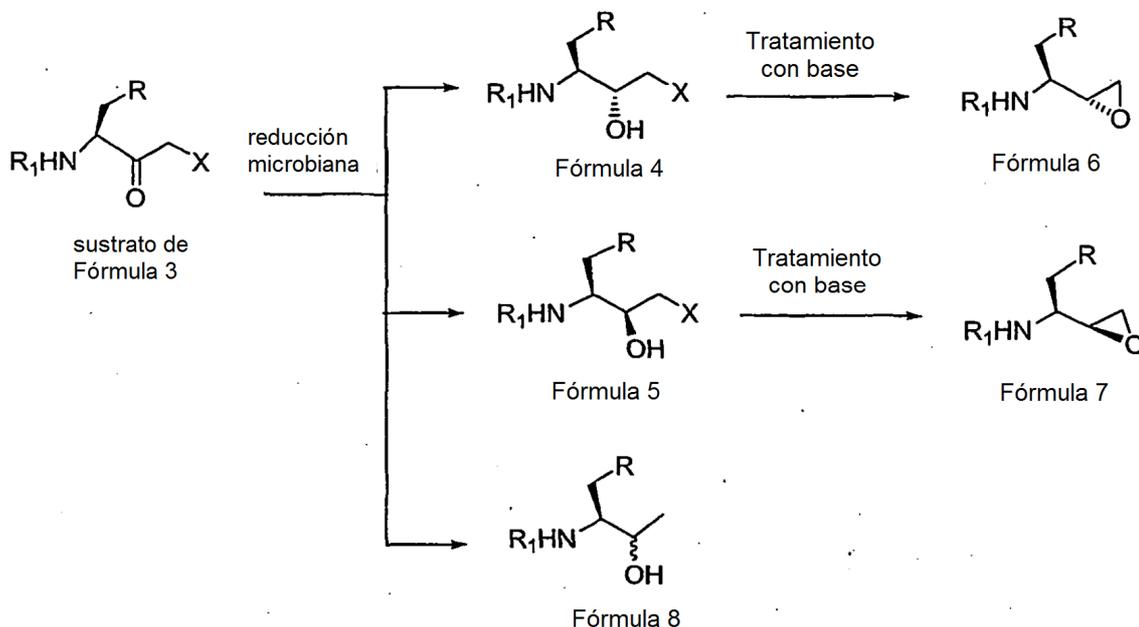


25 en la que X, R y R₁ son como se han definido anteriormente.

Los derivados de 1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula (2) pueden usarse para producir diversos inhibidores de proteasa de VIH, ACE y renina. Los diversos inhibidores de proteasa de VIH que pueden producirse con el intermedio de la fórmula (2) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, los inhibidores de proteasa de VIH desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.849.911 de la columna 2, línea 13 a la columna 12, línea 59. El inhibidor de proteasa de VIH típico que puede producirse mediante el intermedio de la fórmula (2) incluye pero sin limitación, por ejemplo, el compuesto de éster dimetilico del ácido [3S-(3R*,8R*,9R*,12R*)]-3,12-bis(1,1-dimetiletil)-8-hidroxi-4,11-dioxo-9-(fenilmetil)-6[[4-(2-piridinil)fenil]metil]-2,3,6,10,13-pentaazaretetradecanodioico desvelado en la Patente de Estados Unidos N° 5.849.911.

35 Los derivados de 1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula (2) pueden sintetizarse de acuerdo con, por ejemplo, el siguiente esquema de reacción (1):

Esquema de Reacción 1



en el que X, R y R₁ de cada una de las Fórmulas 4-8 son como se han definido anteriormente. De acuerdo con el esquema de reacción (1), la reducción microbiana del sustrato de fórmula 3 en el diastereómero de (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula 4 también puede dar como resultado la producción de un subproducto de diastereómero de (2S,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido no deseado de fórmula 5 y una impureza des-halo alcohol de (3S)-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido indeseada de fórmula 8. El diastereómero de (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido deseado de fórmula 4 se trató posteriormente con una base y se epoxidó para dar el (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido deseado de fórmula 6. El subproducto de diastereómero de (2S,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido no deseado de fórmula 5, sin embargo, debe tratarse con una base epoxidada para dar el (2S,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula 7.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento que comprende preparar (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula:



en la que X es a halógeno, R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, y arilo sustituido, y R₁ representa un grupo protector de amino, poniendo en contacto un *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene depósito ATCC N° PTA-6648 con de 2,5 a aproximadamente 6% p/v, basado en sustrato, de sustrato de (3S)-1-halo-2-oxo-3-(protegido)amino-4-sustituido sustituido de la fórmula:



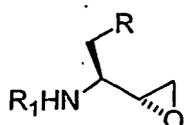
en la que X, R, y R₁ son como se han definido anteriormente.

La presente invención también se refiere a i) producir un exceso diastereomérico del compuesto de fórmula (4) de al

- 5 menos aproximadamente el 95,1%; ii) biotransformar al menos aproximadamente el 99,6% del sustrato de fórmula (3) para dar el compuesto de fórmula (4); iii) obtener el compuesto de fórmula (4) a una pureza diastereomérica de al menos aproximadamente el 96%; y/o iv) producir menos de aproximadamente el 0,6 de porcentaje de área de la impureza des-halo alcohol de fórmula (8) poniendo en contacto *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene un depósito ATCC N° PTA-6648 con el sustrato de fórmula (3) en presencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 6% (p/v) de glicerol.

La presente invención también se refiere a un procedimiento que comprende la utilización de la centrifugación para separar el (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula (4) de al menos una impureza.

- 10 La presente invención se refiere aun más a un procedimiento que comprende mezclar el (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula (4) con al menos una base en presencia de al menos un disolvente seleccionado entre un disolvente orgánico polar y un disolvente orgánico polar y agua para producir una mezcla de reacción que comprende (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula



(6)

- 15 en la que R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y arilo sustituido, y R₁ representa un grupo protector de amino.

- La presente invención también se refiere a un procedimiento que comprende retirar por cristalización el compuesto de fórmula (6) de la mezcla de reacción, mezclando el (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula (4) con al menos una base en presencia de al menos un disolvente seleccionado entre un disolvente orgánico polar y un disolvente orgánico polar y agua, añadiendo conjuntamente agua y la mezcla de reacción.
- 20

La presente invención también se refiere a una *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene el depósito ATCC N° PTA-6648.

Descripción detallada de la invención

- 25 Las características y ventajas de la presente invención pueden comprenderse más fácilmente por los expertos en la materia después de leer la siguiente descripción detallada. Debe apreciarse que ciertas características de la invención que se describen, por razones de claridad, anteriormente y más adelante en el contexto de una sola realización, también pueden combinarse para formar una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención que se describen, por razones de brevedad, en el contexto de una sola realización, también pueden combinarse de manera que formen sub-combinaciones de las mismas.
- 30

A menos que se indique específicamente lo contrario en el presente documento, las referencias hechas en singular también incluyen el plural. Por ejemplo, "un" y "uno" pueden referirse tanto a uno como a uno o más.

- 35 Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades, tales como peso molecular, condiciones de reacción y así sucesivamente, que están precedidos por la palabra "aproximadamente" deben interpretarse únicamente como aproximaciones de manera que pueden usarse ligeras variaciones en el número indicado anteriormente y más adelante para conseguir sustancialmente los mismos resultados que con el número indicado. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos precedidos por la palabra "aproximadamente" son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que pretendan obtenerse mediante la presente invención. Al menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.
- 40

- Debe apreciarse que cada uno de los diversos intervalos indicados pretende ser continuo, de manera que incluyen cada parámetro numérico entre el valor máximo y mínimo indicada de cada intervalo. Debe entenderse también que, aunque sin pretender limitar la aplicabilidad de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos de una manera coherente con el número indicado de dígitos significativos para cada parámetro numérico y aplicando técnicas de redondeo ordinarias. Además, también debe entenderse que, aunque sin pretender limitar la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, aún cuando un número puede estar contenido dentro de un intervalo numérico, en el que al menos uno de los números máximos y mínimos del intervalo está o no precedido por la palabra "aproximadamente", cada valor numérico contenido dentro del intervalo puede estar precedido o no por la palabra "aproximadamente". Por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 incluye aproximadamente 1, aproximadamente 2, 2, aproximadamente 3, 3, aproximadamente 4, 4, aproximadamente 5, 5, aproximadamente 6, 6, aproximadamente 7,
- 45
- 50

7, aproximadamente 8, 8, aproximadamente 9, 9 y aproximadamente 10; un intervalo de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 3,2 incluye aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, 1,2, aproximadamente 1,3, 1,3, aproximadamente 1,4, 1,4, aproximadamente 1,5, 1,5, aproximadamente 1,6, 1,6, aproximadamente 1,7, 1,7, aproximadamente 1,8, 1,8, aproximadamente 1,9, 1,9, aproximadamente 2,0, 2,0, aproximadamente 2,1, 2,1, aproximadamente 2,2, 2,2, aproximadamente 2,3, 2,3, aproximadamente 2,4, 2,4, aproximadamente 2,5, 2,5, aproximadamente 2,6, 2,6, aproximadamente 2,7, 2,7, aproximadamente 2,8, 2,8, aproximadamente 2,9, 2,9, aproximadamente 3,0, 3,0, aproximadamente 3,1, 3,1 y aproximadamente 3,2; y un intervalo de aproximadamente 1 a 4 incluye aproximadamente 1, 2, aproximadamente 2, 3, aproximadamente 3 y 4.

Además, cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se da como una lista de valores superiores y valores inferiores, dichos listados pretenden incluir todos los intervalos formados emparejando cualquiera de los valores superiores con cualquiera de los valores inferiores, independientemente de si los intervalos se describen por separado.

La abreviatura "e.d." como se usa en el presente documento significa "exceso diastereomérico".

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene de 1 a 7 átomos de carbono. Los grupos "alquilo" ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, metilo; etilo; propilo; isopropilo; *n*-butilo; *t*-butilo; pentilo; hexilo; isohexilo; heptilo y 4,4-dimetilpentilo.

La expresión "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Es de importancia indicar que aunque la expresión "alquilo inferior" está incluida dentro de la definición de "alquilo", el uso de la expresión "alquilo inferior" no pretende limitar la definición del término "alquilo" tanto implícita como explícitamente a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene de 5 a 7 átomos de carbono. Los grupos alquilo inferior ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, metilo; etilo; propilo; isopropilo; *n*-butilo; *t*-butilo; e isobutilo.

La expresión "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo sustituido en cualquier posición sustituible y disponible con uno a cuatro sustituyentes seleccionados entre, por ejemplo, H; halógeno; trifluorometilo (-CF₃); trifluorometoxi (-OCF₃); hidroxilo (-OH); alcoxi; cicloalcoxi; heterociclooxi; oxo (=O); alcanóilo; alquilo; arilo; arilo sustituido; ariloxi; aralquilo; alcanoiloxi; amino (NH₂); alquilamino; arilamino; aralquilamino; cicloalquilamino; heterocicloamino; y/o amino disustituido.

El término "halógeno" o "halo" se refiere a cloro, bromo, flúor y yodo.

El término "arilo" se refiere a anillos hidrocarburo aromáticos monocíclicos o bicíclicos que tienen de 6 a 12 átomos de carbono en la porción de anillo. Los grupos arilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, grupos fenilo; naftilo; bifenilo; y difenilo.

La expresión "arilo sustituido" se refiere a un grupo arilo sustituido con al menos un sustituyente, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier posición del anillo sustituible o disponible, o donde la valencia lo permita en cualquiera de los anillos condensados o unidos al mismo. Al menos uno de los sustituyentes, por ejemplo, puede seleccionarse entre H; alquilo; alquilo sustituido; halo; trifluorometilo (-CF₃); trifluorometoxi(-OCF₃); hidroxilo (-OH); alcoxi; cicloalcoxi; heterociclooxi; alcanóilo; alcanoiloxi; amino (NH₂); alquilamino; dialquilamino; arilo; aralquilamino; cicloalquilamino; heterocicloamino; alcanoilamino; tiol (-SH); alquiltio; cicloalquiltio; heterociclootio; ureido; nitro (-NO₂); ciano (-C≡N); carboxi (-CO₂H); carboxialquilo; carbamilo (-C(=O)NH₂); alcocicarbonilo; alquiltionio; ariltionio; alquilsulfonilo; sulfonamido (-SO₂NH₂); y/o ariloxi. Cualquier sustituyente elegido puede estar adicionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre H; halo; hidroxil (-OH); alquilo; alcoxi, arilo; alquilo sustituido; y aralquilo. Cuando un arilo está sustituido, cada anillo del arilo puede estar sustituido.

El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillos hidrocarburo cíclicos no aromáticos saturados o parcialmente insaturados. Por ejemplo, un grupo cicloalquilo puede contener 1 a 3 anillos con 3 a 7 carbonos por anillo, que puede estar opcionalmente condensado con un anillo carbocíclico insaturado que contiene de 3 a 7 carbonos. Los grupos "cicloalquilo" ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, ciclopropilo; ciclobutilo; ciclopentilo; ciclohexilo; cicloheptilo; ciclobutenilo, cicloptenilo y ciclohexenilo.

La expresión "cicloalquilo sustituido" se refiere a un cicloalquilo sustituido con al menos un sustituyente, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, más preferentemente de 1 a 2 sustituyentes, en cualquier punto de unión disponible tanto en el anillo cicloalquilo como, donde la valencia lo permita, en cualquiera de los anillos condensados o unidos al mismo. Los sustituyentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, alquilo sustituido; y/o al menos un sustituyente descrito anteriormente como un sustituyente alquilo ejemplar en la definición de la expresión "alquilo sustituido".

Los términos "heterociclilo", "heterociclo" y "heterocíclico" se refieren a un a un grupo cíclico aromático o no aromático, totalmente saturado o insaturado es decir, por ejemplo, un sistema de anillos monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclico de 7 a 11 miembros o tricíclico de 10 a 15 miembros que tiene al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene átomo de carbono. Cada anillo que contiene heteroátomo del heterociclo, heterocíclico o heterociclo puede contener 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados entre N, O y/o S, en el que N y/o S pueden estar

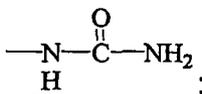
opcionalmente oxidados y/o el N opcionalmente cuaternizado. El heterociclo, heterocíclico o heterociclilo puede estar unido al resto de la molécula mediante cualquier heteroátomo o átomo de carbono disponible.

Los grupos monocíclicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, pirrolidinilo, pirrolilo, indolilo, pirazolilo, oxetanilo, pirazolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolinilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, furilo, tetrahidrofurilo, tienilo, oxadiazolilo, piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxazepinilo, azepinilo, 4-piperidonilo, piridilo, N-oxo-piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinil sulfóxido, tiamorfolinil sulfona, 1,3-dioxolano y tetrahidro-1,1-dioxotienilo, dioxanilo, isotiazolidinilo, tietanilo, tiiranilo, triazinilo y triazolilo.

- 10 Los grupos heterocíclicos bicíclicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, 2,3-dihidro-2-oxo-1H-indolilo; benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzotienilo, quinuclidinilo, quinolinilo, quinolinil-N-óxido, tetrahidroisoquinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, benzopiranilo, indolizínilo, benzofurilo, cromonilo, coumarinilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo (tal como furo[2,3-c]piridinilo, furo[3,1-b]piridinil] o furo[2,3-b]piridinilo), dihidroisindolilo, dihidroquinazolinilo (tal como 3,4-dihidro-4-oxo-quinazolinilo), benzoisotiazolilo, benzoisoxazolilo, benzodiazinilo, benzofurazanilo, benzotiopiranilo, benzotriazolilo, benzopirazolilo, dihidrobenzofurilo, dihidrobenzotienilo, dihidrobenzotiopiranilo, dihidrobenzotiopiranil sulfona, dihidrobenzopiranilo, indolinilo, isocromanilo, isoindolinilo, naftiridinilo, ftalazinilo, piperonilo, purinilo, piridopiridilo, quinazolinilo, tetrahidroquinolinilo, tienofurilo, tienopiridilo y tienotienilo.

Los heterociclos más pequeños incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, epóxidos y aziridinas.

- 20 Las expresiones "heterociclo sustituido", "heterocíclico sustituido" y "heterociclilo sustituido" se refieren a un heterociclo, heterocíclico y heterociclilo, respectivamente, sustituido en cualquier punto de unión disponible, o donde la valencia lo permita en cualquiera de los anillos condensados o unidos al mismo, con alquilo sustituido y/o al menos un sustituyente descrito anteriormente como un sustituyente alquilo ejemplar en la definición de la expresión "alquilo sustituido".
- 25 Las definiciones para los otros diversos grupos recitados en el presente documento son como se indican a continuación: alcoxi es $-OR^a$; cicloalcoxi es $-OR^b$; heterociclooxi es $-OR^c$; alcanoil es $-C(=O)R^a$; ariloxi es $-OAr$; alcanoiloxi es $-OC(=O)R^a$; alquilamino es $-NHR^a$; arilamino es $-NHAr$; aralquilo es $-R^aAr$; aralquilamino es $-NHR^aAr$; amino disustituido es $-NR^dR^e$; dialquilamino es $-NR^aR^a$; cicloalquilamino $-NHR^b$; heterocicloamino $-NHR^c$; alcanoilamino es $-NHC(=O)R^a$; alquiltio es $-SR^a$; cicloalquiltio es $-SR^b$; heterociclotio es $-SR^c$; ureido es H



- 30 ; carboxialquilo es $-R^aCO_2H$; alcoxicarbonilo es $-C(=O)OR^a$; aralquiloicarbonilo es $-C(=O)OR^aAr$; alquiltiono es $-S(=O)R^a$; ariltiono es $-S(=O)Ar$; y alquilsulfonil es $-SO(q)R^a$, en los que R^a es alquilo o alquilo sustituido; R^b es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R^c es heterociclo o heterociclo sustituido; R^d y R^e se seleccionan entre alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y aralquilo; Ar es un arilo o arilo sustituido; y q es 2 ó 3.

- 35 A menos que se indique otra cosa, cuando se usa el término "insaturado" en el presente documento para referirse a un anillo o grupo, el anillo o grupo puede estar totalmente insaturado o parcialmente insaturado.

- 40 El término "carbocíclico" significa un anillo monocíclico o bicíclico, saturado o insaturado, en el que todos los átomos de todos los anillos son carbono. Por lo tanto, el término incluye anillos cicloalquilo y arilo. El anillo carbocíclico puede estar sustituido, en cuyo caso los sustituyentes se seleccionan entre los indicados anteriormente para grupos arilo.

- 45 La expresión "grupo protector de amino" se refiere a restos reconocidos en la técnica capaces de unirse a un grupo amino de manera que previenen que el grupo amino actúe en reacciones que suceden en cualquier otra parte de la molécula a las que el grupo amino está unido. Los grupos protectores de amino aceptables incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, grupos protectores de amino descritos en "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª edición, John Wiley & Sons, 1991. El grupo protector de amino puede, por ejemplo, ser un grupo protector de tipo uretano (que también se denomina un grupo protector carbamato) tal como, por ejemplo, grupos aralquiloicarbonilo y grupos alcoxicarbonilo. Un grupo protector de amino puede seleccionarse, por ejemplo, entre benciloicarbonilo; metoxycarbonilo; y *tert*-butoxicarbonilo. Típicamente, el grupo protector de amino es *tert*-butoxicarbonilo.

- 50 La abreviatura "ATCC" se refiere a la Asociación Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 y/o el número de acceso asignado por la ATCC al depositario del microorganismo en particular indicado junto con la abreviatura ATCC.

Fermentación y Biotransformación

La presente invención se refiere a un procedimiento que comprende preparar (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula:



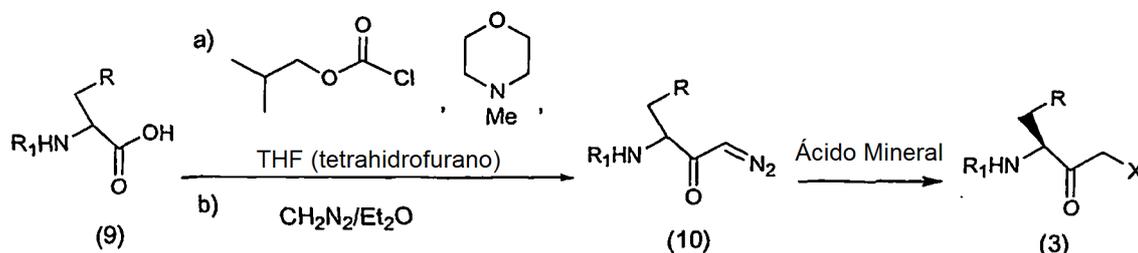
- 5 en la que X es a halógeno, R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y arilo sustituido, y R₁ representa un grupo protector de amino, poniendo en contacto una cepa de *Rhodococcus erythropolis* mutagenizada que tiene un depósito de la ATCC N° PTA-6648 con de 2,5 a aproximadamente 6% p/v, basado en sustrato, de sustrato (3S)-1-halo-2-oxo-3-(protegido)amino-4-sustituido sustituido de la fórmula:



en la que X, R y R₁ son como se han definido anteriormente.

- 10 El sustrato de fórmula 3 puede producirse de acuerdo con procedimientos fácilmente conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, el sustrato de fórmula (3) puede sintetizarse de acuerdo con el siguiente esquema de reacción 2:

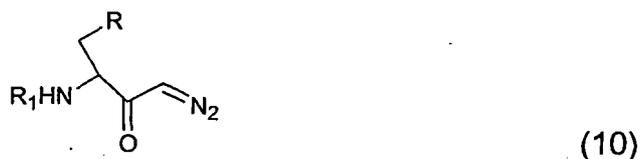
Esquema de Reacción 2



De acuerdo con el esquema de reacción 2, el ácido N-amino protegido de la fórmula:



- 15 en la que R y R₁ son como se han definido anteriormente, se trata con un formiato de alquilo, tal como, por ejemplo, cloroformiato de isoburilo, y una amina terciaria, tal como, por ejemplo, N-metil morfolina, seguido de la adición de una solución de diazometano/éter dietílico para dar un diazocetona de ácido N-amino protegido de la fórmula:



- 20 en la que R y R₁ son como se han definido anteriormente. Después, el compuesto de fórmula (10) puede tratarse con un ácido mineral, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl) o ácido bromhídrico (HBr) para producir el sustrato deseado de fórmula (3).

El sustrato de fórmula (3) también puede sintetizarse, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula:

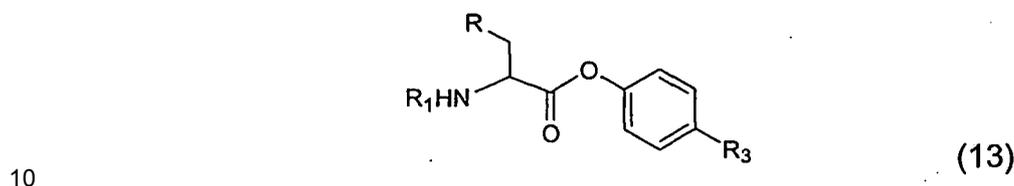


en la que R y R₁ son como se han definido anteriormente y R₂ se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido y bencilo, con al menos 2 equivalentes molares de un compuesto de la fórmula:



en la que X₁ y X₂ se seleccionan independientemente entre cloro, bromo, yodo y flúor, con la condición de que al menos uno de X₁ o X₂ sea bromo o yodo.

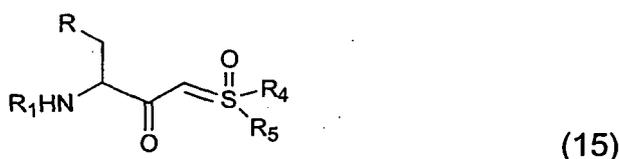
Además, si X de fórmula (3) es cloro y R y R₁ son como se han definido anteriormente, el sustrato de (3S)-1-cloro-2-oxo-3-(protegido)amino-4-butano sustituido puede sintetizarse, por ejemplo, tratando un compuesto de la fórmula:



en la que R y R₁ son como se han definido anteriormente y R₃, que puede estar sustituido en el anillo fenilo tanto en la posición orto como en la para, se selecciona entre hidrógeno y nitrógeno con iluro de azufre que contiene el compuesto de la fórmula:



15 en la que R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido para producir un compuesto ceto iluro intermedio de la fórmula:



20 en la que R, R₁, R₄, y R₅ son como se han definido anteriormente. Después, el compuesto de fórmula (15) puede hacerse reaccionar con una fuente de cloruro que puede incluir, pero sin limitación, por ejemplo, una fuente básica de cloruro, tal como, por ejemplo, cloruro de litio; y un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido metanosulfónico.

25 En una realización, el sustrato de fórmula (3) es (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano. El sustrato de (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano puede producirse de acuerdo con procedimientos fácilmente conocidos por un experto en la materia, incluyendo pero sin limitación, por ejemplo los procedimientos generales ya expuestos anteriormente en el presente documento para la preparación del sustrato de fórmula (3).

En una realización, el compuesto de fórmula (4) producido es (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano.

30 El compuesto de fórmula (4) puede producirse poniendo en contacto el sustrato de fórmula (3) con una cepa de *Rhodococcus erythropolis* mutagenizada que tiene el N° depósito de ATCC PTA-6648. La cepa de *Rhodococcus erythropolis* mutagenizada que tiene el N° depósito de ATCC PTA-6648 puede producir una enzima cetorreductasa capaz de biotransformar o de reducir enzimáticamente el sustrato de fórmula (3) al compuesto de fórmula (4).

En una realización, las células PTA-6648 de la ATCC se ponen en contacto con sustrato de fórmula (3) desde el 2,5

hasta aproximadamente el 6% p/v, en base al sustrato.

En otra realización, las células PTA-6648 de la ATCC se ponen en contacto con sustrato de fórmula (3) desde aproximadamente el 4,5 hasta aproximadamente el 6% p/v, en base al sustrato.

5 En otra realización más, las células PTA-6648 de la ATCC se ponen en contacto con sustrato de fórmula (3) a aproximadamente el 6% p/v, en base al sustrato.

10 Las células PTA-6648 de la ATCC se pueden suministrar, por ejemplo, como células húmedas o secas intactas, tales como, por ejemplo, células liofilizadas, secadas por pulverización o secadas por calentamiento o como material celular tratado, tal como, por ejemplo, células rotas o extracto celular. Las células PTA-6648 de la ATCC se pueden cultivar a una densidad celular elevada de acuerdo con cualquier procedimiento de fermentación conocido fácilmente por un experto en la materia incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, un procedimiento de fermentación semicontinuo. Las células PTA-6648 de la ATCC se pueden cultivar en un recipiente, tal como, por ejemplo, un matraz de agitación o un tanque fermentador.

El sustrato de fórmula (3) se puede biotransformar en el compuesto de la fórmula (4) poniéndose en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en un procedimiento de etapa única o *in situ* o un procedimiento de dos etapas.

15 El procedimiento de etapa única o *in situ* implica biotransformar de forma simultánea el sustrato de fórmula (3) en el compuesto de fórmula (4) mientras al menos algunas de las células PTA-6648 de la ATCC están aún en fermentación. Es decir, el sustrato de fórmula (3) se puede poner en contacto con las células PTA-6648 de la ATCC antes de que todas las células hayan terminado de fermentar. Por ejemplo, las células PTA-6648 de la ATCC se pueden cultivar en medio hasta que se realiza cultivo celular suficiente. Tras la realización suficiente del cultivo de
20 células PTA-6648 de la ATCC, el sustrato de fórmula (3) se puede añadir directamente al medio que contiene células PTA-6648 de la ATCC para formar una pasta de mezcla de reacción que comprende células PTA-6648 de la ATCC y sustrato de fórmula (3). El sustrato de fórmula (3) después se puede permitir que se biotransforme en el compuesto de fórmula (4) durante una cantidad de tiempo eficaz para posibilitar sustancialmente que todo el sustrato de fórmula (3) se biotransforme en el compuesto de fórmula (4).

25 El procedimiento de dos etapas implica en primer lugar fermentar por separado las células PTA-6648 de la ATCC y después tras la finalización de la fermentación, poner en contacto el sustrato de fórmula (3) con las células PTA-6648 de la ATCC fermentadas. Es decir, el procedimiento de dos etapas implica en primer lugar fermentar por separado las células y después usar las células fermentadas por separado para biotransformar el sustrato de fórmula (3) en el compuesto de fórmula (4). Más específicamente, en el procedimiento de dos etapas las células
30 PTA-6648 de la ATCC se pueden cultivar en medio hasta que se muestra un nivel de actividad enzimática de cetorreductasa predeterminado. Cuando el nivel deseado de actividad enzimática se obtiene, las células cultivadas se pueden separar del medio y mezclarse con, por ejemplo, tampón de fosfato de sodio 0,1 M para producir una pasta de células PTA-6648 de la ATCC que tiene un pH de 7,4. El sustrato de fórmula (3) después se puede añadir a la pasta de células PTA-6648 de la ATCC para formar una pasta de mezcla de reacción que comprende células
35 PTA-6648 de la ATCC y sustrato de fórmula (3). El sustrato de fórmula (3) después se puede permitir que biotransforme en el compuesto de fórmula (4) durante una cantidad de tiempo eficaz para posibilitar sustancialmente que todo el sustrato de fórmula (3) se biotransforme en el compuesto de fórmula (4).

El sustrato de fórmula (3) se puede añadir como un polvo o como una pasta en glicerol y agua. Típicamente, sin embargo, el sustrato de fórmula (3) se añade como una pasta en glicerol y agua.

40 En una realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con las células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 a aproximadamente el 6% (p/v).

En otra realización, se añaden fuentes de glucosa y carbono de glicerol a la pasta de mezcla de reacción a través de toda la biotransformación para mantener una concentración de aproximadamente el 2,2% (p/v) de glucosa y una concentración de aproximadamente el 6% (p/v) de glicerol.

45 Las células PTA-6648 de la ATCC se pueden cultivar en medio de acuerdo con cualquier procedimiento de fermentación aceptable conocido por un experto en la materia incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, un procedimiento de fermentación semicontinuo.

50 Un experto en la materia está familiarizado con medios aceptables para cultivar células PTA-6648 de la ATCC incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, medios que comprenden caldo; una fuente de carbono; una fuente de nitrógeno; un elemento trazas y un agente antiespumante. El medio seleccionado puede tener un pH, por ejemplo, de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8 y típicamente de aproximadamente 7,0. Típicamente, el medio utilizado es acuoso.

55 El caldo contenido en el medio incluye pero no está limitado a, por ejemplo, caldo tríptico de soja (triptona al 1,7%, soytona al 0,3%, cloruro de sodio al 0,5%, glucosa al 0,25%, fosfato dipotásico al 0,25% y pH 7,0) y medio F7 (glucosa al 2,2%, extracto de levadura al 1%, extracto de malta al 1%, peptona al 0,1% y pH 7,0).

ES 2 376 345 T3

La fuente de carbono contenida típicamente en el medio incluye pero sin limitación, por ejemplo, azúcar, tal como, por ejemplo, maltosa, lactosa, glucosa, fructosa, glicerol, sorbitol, sacarosa, almidón y manitol y ácidos orgánicos y sus sales, tales como, por ejemplo, acetato de sodio y citrato de sodio.

5 La fuente de nitrógeno típicamente contenida en el medio incluye pero sin limitación, por ejemplo, N-Z amina A; licor de maíz fermentado; harina de soja; extractos de levadura; melazas; levadura del pan; triptona; nutrisoja; peptona; yeastamin; nitrato de sodio y sulfato de amonio.

Los elementos trazas contenidos típicamente en el medio incluyen pero sin limitación, por ejemplo, fosfato y una sal de magnesio, manganeso, calcio, cobalto, níquel, hierro, sodio y/o potasio.

El agente antiespumante típicamente contenido en el medio incluye, pero sin limitación, por ejemplo, propilenglicol.

10 Los medios disponibles en el mercado aceptables para cultivar células PTA-6648 de la ATCC, incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, caldo tríplico de soja alternativo (disponible en Becton Dickinson Company, Sparks, MD), que contiene proteína de soja al 1,8%; extracto de levadura al 0,2%; cloruro de sodio al 0,5%; glucosa al 0,25% y fosfato dipotásico al 0,25%.

15 El medio puede, antes de inocularse con células PTA-6648 de la ATCC, esterilizarse mediante, por ejemplo, calentamiento hasta una temperatura de aproximadamente 121 °C durante aproximadamente 30 minutos. Después el pH del medio se puede ajustar, por ejemplo, hasta un pH de desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 7,5 y típicamente hasta un pH de aproximadamente 7,0. El pH se puede ajustar con, por ejemplo, una base, tal como, por ejemplo, hidróxido de amonio o un ácido, tal como, por ejemplo, ácido fosfórico. El pH del medio, sin embargo, se puede ajustar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia.

20 Un experto en la materia puede usar cualquier procedimiento capaz de detectar el punto en el que sustancialmente todo el sustrato de fórmula (3) se ha biotransformado en el compuesto de fórmula (4), incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, análisis de HPLC. Sin embargo, típicamente sustancialmente todo el sustrato de fórmula (3) se biotransforma en el compuesto de fórmula (4) en aproximadamente 4 hasta aproximadamente 96 horas después de que el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con las células PTA-6648 de la ATCC y aún más típicamente en
25 aproximadamente 4 a aproximadamente 48 horas.

La cantidad total de sustrato de fórmula (3) que se tiene que añadir a las células PTA-6648 de la ATCC se puede dividir en cuatro partes iguales, en las que la parte uno se añade a aproximadamente 0 horas, la parte dos a aproximadamente 4 horas, la parte tres a aproximadamente 8 horas y la parte cuatro a aproximadamente 23 horas. Por ejemplo, si se tiene que añadir un total de aproximadamente el 6% p/v de sustrato de fórmula (3) a las células, el
30 aproximadamente 6% p/v de sustrato de fórmula (3) se divide en cuatro partes iguales de aproximadamente el 1,5% p/v cada una, en la que la primera parte de aproximadamente el 1,5% p/v se añade aproximadamente 0 horas, la segunda parte a aproximadamente 4 horas, la tercera parte a aproximadamente 8 horas y la cuarta parte a aproximadamente 23 horas.

35 Como alternativa, el sustrato de fórmula (3) se puede añadir de forma continua a las células PTA-6648 de la ATCC a lo largo de un periodo de tiempo que varía desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 24 horas. Por ejemplo, si el sustrato de fórmula (3) se añade en forma sólida, el sustrato de fórmula (3) se puede añadir a las células PTA-6648 de la ATCC a través de, por ejemplo, un alimentador sin fin sólido que está ajustado a un índice de suministro constante de forma de posibilitar que la cantidad total de sustrato que se está añadiendo a las células PTA-6648 de la ATCC se añada dentro del lapso de tiempo deseado. Un experto en la materia está familiarizado con procedimientos similares que se pueden usar para añadir una pasta de sustrato de fórmula (3) en, por ejemplo,
40 glicerol/agua a las células PTA-6648 de la ATCC.

De acuerdo con los procedimientos de etapa única o *in situ*, un experto en la materia está familiarizado en general con procedimientos disponibles para determinar el punto en el cual se ha realizado un cultivo de células PTA-6648 de la ATCC suficiente. Por ejemplo, las células PTA-6648 de la ATCC generalmente se han cultivado
45 suficientemente cuando la densidad óptica a 600 nm del cultivo es mayor de 0,5.

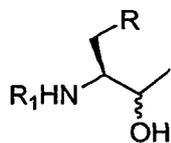
De acuerdo con el procedimiento de dos etapas, el nivel predeterminado de actividad enzimática de cetorreductasa es el punto en el cual se ha acumulado una cantidad óptima de enzima cetorreductasa en la fermentación. Una cantidad óptima de enzima cetorreductasa se puede obtener típicamente después de, por ejemplo, aproximadamente 60 a aproximadamente 96 horas de fermentación.

50 En el procedimiento de dos etapas, las células PTA-6648 de la ATCC se pueden separar del medio con técnicas de separación convencionales conocidas fácilmente por un experto en la materia. Tales técnicas de separación convencionales incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, filtración de membrana y centrifugación.

La pasta de mezcla de reacción que contiene las células PTA-6648 de la ATCC y el sustrato de fórmula (3) también puede contener un agente de tamponamiento. Los agentes de tamponamiento típicos incluyen, pero sin limitación,
55 por ejemplo, tampón fosfato; tampón de tris-clorhidrato; tampón de bicina [N,N-bis(2-hidroxi-etil)glicina]; tampón de tricina [N-tris(hidroxi-etil)metilglicina] y tampón de acetato de sodio.

- 5 En una realización, el sustrato de fórmula (3) se biotransforma en el compuesto de fórmula (4) mientras que la pasta de mezcla de reacción se está aireando y agitando. La pasta de mezcla de reacción se puede airear con, por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm) o, por ejemplo, con aproximadamente 5 vvm. La pasta de mezcla de reacción se puede agitar, por ejemplo, a aproximadamente 100 a aproximadamente 2000 RPM, o, por ejemplo, a aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 RPM.
- En una realización, la pasta de mezcla de reacción contiene desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 40% p, en base al peso de células húmedo, células PTA-6648 de la ATCC.
- 10 En otra realización, la pasta de mezcla de reacción contiene desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 35% p, en base al peso húmedo de células, células PTA-6648 de la ATCC.
- En otra realización, la pasta de mezcla de reacción contiene aproximadamente el 30% p, en base al peso húmedo de células, células PTA-6648 de la ATCC.
- 15 A través de todo el procedimiento de fermentación y biotransformación el pH se puede mantener, por ejemplo, a aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,0, o, por ejemplo, a aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0; la temperatura se puede mantener, por ejemplo, a aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 38 °C o, por ejemplo, a aproximadamente 25 ° hasta aproximadamente 32 °C y la presión se puede mantener, por ejemplo, a aproximadamente presión atmosférica.
- 20 En una realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) de glicerol para obtener compuesto de fórmula (4) en un exceso diastereomérico de al menos aproximadamente el 95,1%.
- En otra realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) de glicerol para obtener compuesto de fórmula (4) en un exceso diastereomérico de al menos aproximadamente el 95,6%.
- 25 En aún otra realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) en un exceso diastereomérico de al menos aproximadamente el 96%.
- En incluso una realización adicional, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) en un exceso diastereomérico de al menos aproximadamente el 97%.
- 30 En una realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para biotransformar al menos aproximadamente el 99,6% de sustrato de fórmula (3) en compuesto de fórmula (4).
- En otra realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para biotransformar al menos aproximadamente el 99,8% de sustrato de fórmula (3) en compuesto de fórmula (4).
- 35 En otra realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para biotransformar al menos aproximadamente el 100% del sustrato de fórmula (3) en compuesto de fórmula (4).
- 40 En una realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) a una pureza diastereomérica de al menos aproximadamente el 96%.
- En otra realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) a una pureza diastereomérica de al menos aproximadamente el 97,5%.
- 45 En otra realización, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) a una pureza diastereomérica de al menos el 97,9%.
- 50 En una realización adicional, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) a una pureza diastereomérica de al menos aproximadamente el 98,0%.
- En una realización adicional más, el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v) para obtener compuesto de fórmula (4) a una pureza diastereomérica de al menos aproximadamente el 98,5%.

En una realización, un porcentaje de área de menos de aproximadamente 0,6 de impureza des-halo alcohol (3S)-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula:



(8)

5 en la que R y R₁ son como se ha descrito anteriormente, se produce cuando el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de glicerol a aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v).

En otra realización, menos de aproximadamente el 0,5 de porcentaje de área de la impureza de fórmula 8 se produce cuando el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v).

10 En otra realización, menos de aproximadamente el 0,4 porcentaje de área de la impureza de fórmula 8 se produce cuando el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v).

En incluso una realización adicional, menos de aproximadamente el 0,2 de porcentaje de área de la impureza de fórmula 8 se produce cuando el sustrato de fórmula (3) se pone en contacto con células PTA-6648 de la ATCC en presencia de aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 6% (p/v).

15 En una realización, la impureza de des-halo alcohol (3S)-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula 8 es ((1S)-1-bencil-2-hidroxipropil)carbamato de *tert*-butilo.

Centrifugación

20 Después de que sustancialmente todo el sustrato de fórmula (3) se ha biotransformado en compuesto de fórmula (4), el compuesto de fórmula (4) se puede separar de la pasta de mezcla de reacción.

El compuesto de fórmula (4) se puede separar a través de un procedimiento de centrifugación que implica en primer lugar centrifugar la pasta de mezcla de reacción para producir a) una capa pesada que contiene compuesto de fórmula (4) y b) sobrenadante que contiene al menos una impureza y en segundo lugar extraer el compuesto de fórmula (4) en un disolvente orgánico.

25 En una realización, aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 35% de compuesto de fórmula (4) está contenido en la capa pesada.

En otra realización, aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 35% de compuesto de fórmula (4) está contenido en la capa pesada.

30 En otra realización, aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 35% de compuesto de fórmula (4) está contenido en la capa pesada.

La al menos una impureza que puede estar contenida en el sobrenadante incluye, pero sin limitación, por ejemplo, el subproducto de diastómero de (2S, 3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula 5; al menos aproximadamente el 70% de células PTA-6648 de la ATCC; propilenglicol y sales.

35 Los tipos de centrifugas que se pueden usar de acuerdo con el presente procedimiento incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, una centrifuga Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Bench top Centrifuge (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) y un Westfalia Concurrent Extractor-Decanter (Westfalia Separator AG, Oelde, Germany).

40 En general, aunque la velocidad a la que la pasta de mezcla de reacción se centrifuga dependerá del tipo de centrifuga seleccionado, la velocidad de centrifugación está típicamente optimizada. Por ejemplo, si se usa una centrifuga Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Bench top Centrifuge, la pasta de mezcla de reacción se puede centrifugar a una velocidad optimizada de aproximadamente 3700 RPM durante al menos aproximadamente 5 minutos.

45 La velocidad de centrifugación optimizada de la Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Bench top Centrifuge, sin embargo, se puede usar para calcular la velocidad de centrifugación óptima de otras centrifugas que se pueden usar para centrifugar la pasta de mezcla de reacción de la presente invención. Por ejemplo, la velocidad optimizada de la Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Bench top Centrifuge de 3700 RPM se

puede convertir a fuerza g, que es la fuerza de gravedad generada por la centrifuga, a través de la siguiente ecuación:

$$\text{fuerza g} = \frac{r \cdot (\text{rpm} \cdot 3,14 / 30)^2}{9,81} ;$$

r = radio del rotor, es decir radio en metros desde el husillo hasta el fondo de la muestra;
rpm = revoluciones por minuto y
g es la aceleración debido a la gravedad (9,81 m/s²).

Ya que el radio del rotor de la centrifuga Beckman Coulter Allegra[®] 64R High-Speed Refrigerated Bench top Centrifuge es 0,204 m y la velocidad optimizada de centrifugación es 3700 RPM, la fuerza g de la centrifuga se calcula que es aproximadamente 3119 x g. Esta fuerza g calculada después se puede usar junto con el radio conocido de otra centrifuga para calcular las RPM aproximadas necesarias para satisfacer la fuerza g calculada de la Beckman Coulter Allegra[®] 64R High-Speed Refrigerated Bench top Centrifuge.

En una realización. La pasta de mezcla de reacción se puede enfriar, sin congelarse, hasta una temperatura desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 25 °C antes de centrifugarse.

En otra realización, la pasta de mezcla de reacción se puede enfriar, sin congelarse, hasta una temperatura de desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 12 °C antes de centrifugarse.

En aun otra realización, la pasta de mezcla de reacción puede enfriarse, sin congelarse, hasta una temperatura de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 °C antes de centrifugarse.

En centrifugaciones discontinuas, el tamaño de la botella de centrifuga, el volumen de pasta de mezcla de reacción, la temperatura de la pasta de mezcla de reacción, las rpm de la centrifuga y la longitud de tiempo que la pasta de mezcla de reacción se centrifuga pueden todas afectar la parte de capa pesada recogida y la cantidad de impureza eliminada a través del sobrenadante. Sin embargo, un experto en la materia generalmente conoce cómo cada uno de estos parámetros se pueden ajustar de forma de optimizar la cantidad de cristales de fórmula (4) contenida en la capa pesada mientras que también optimiza la cantidad de impurezas eliminadas a través del sobrenadante.

En centrifugaciones discontinuas, la capa pesada recogida se puede deshidratar sometiéndola a una segunda etapa de centrifugación que posibilita que una capa pesada más seca se separe del sobrenadante adicional. La capa pesada más seca después se puede recoger y el sobrenadante descartarse. Las centrifugas que se pueden usar para deshidratar la capa pesada recogida incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las centrifugas que ya se han descrito en el presente documento anteriormente.

La capa pesada más seca contiene a) una capa superior de color oscuro que comprende células PTA-6648 de la ATCC y < 1% en peso, en base a la capa superior de color oscuro, de cristales de fórmula (4) y b) una capa inferior de color claro que comprende aproximadamente el 20 a aproximadamente el 35%, en base a la capa inferior de color claro, de cristales de fórmula (4), aproximadamente el 50 a aproximadamente el 60%, en base a la capa inferior de color claro, de agua y aproximadamente el 5 a aproximadamente el 30%, en base a la capa inferior de color claro, de células PTA-6648 de la ATCC residuales. La capa superior de color oscuro se puede separar típicamente de la capa inferior de color claro mediante, por ejemplo, eliminación manual con, por ejemplo, una espátula.

Sin embargo, un experto en la materia puede ser consciente de que están disponibles centrifugas a escala de planta que pueden eliminar las etapas de deshidratación y separación manual de centrifugaciones discontinuas. Por ejemplo, una centrifuga Westfalia Concurrent Extractor-Decanter (Westfalia Separator AG, Oelde, Alemania) puede producir directamente una capa pesada satisfactoriamente seca a partir de la pasta de mezcla de reacción. Adicionalmente, la elección del anillo estanco apropiado y la optimización de velocidad diferencial entre el desplazamiento y el cuenco de la centrifuga Westfalia Extractor-Decanter puede posibilitar que los cristales de fórmula (4) se separen directamente de la masa de las células PTA-6648 de la ATCC.

Después de separarse a través de centrifugación, el compuesto de fórmula (4) se puede extraer en un disolvente orgánico mezclando la capa pesada o la capa inferior de color claro que contiene los cristales de fórmula (4) con al menos un disolvente orgánico para formar una primera pasta. La primera pasta se puede formar, por ejemplo, mezclando la capa pesada o la capa inferior de color claro con al menos uno de los disolventes orgánicos durante al menos aproximadamente 5 minutos.

Los disolventes orgánicos ejemplares en los que puede extraerse el compuesto de fórmula (4) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, un disolvente aprótico polar, tal como, por ejemplo, acetona, metil etil cetona, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,3-dioxolano, 1,2-dimetoxietano, dimetil éter de dietilenglicol, trietilenglicol dimetil éter, dimetil éter de tetra-etilenglicol, dimetil éter de polietilenglicol, 1,2-dietoxietano, éter dietílico de dietilenglicol, éter dietílico de trietilenglicol, éter dietílico de tetraetilenglicol, éter dietílico de polietilenglicol, acetonitrilo,

dimetilformamida y dimetilsulfóxido; un disolvente orgánico prótico polar, tal como, por ejemplo, alcoholes, tal como, por ejemplo, metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol, *sec*-butanol, isobutanol y *terc*-butanol; y combinaciones de los mismos.

En una realización, al menos uno de los disolventes orgánicos es un disolvente orgánico prótico polar.

5 En otra realización, el disolvente orgánico prótico polar es alcohol isopropílico [IPA].

Para facilitar la epoxidación y cristalización posteriores, es de importancia indicar que el uso de un disolvente inmisible en agua, tal como, por ejemplo, acetato de etilo, MTBE y/o heptano para extraer el compuesto de fórmula (4) puede implicar 1) retirar por destilación el disolvente inmisible en agua, y 2) reemplazar el disolvente inmisible en agua que se ha retirado por filtración con un disolvente más miscible en agua, tal como, por ejemplo, acetona y/o
10 IPA.

La fase pesada o fase inferior de color claro puede mezclarse con de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 volúmenes de al menos un disolvente orgánico, y típicamente con de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 volúmenes.

15 La primera suspensión puede prepararse una temperatura que varía de aproximadamente 0 a aproximadamente 98 °C, y típicamente a una temperatura que varía de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 °C.

Después, la primera suspensión puede centrifugarse para separar la suspensión en 1) una fase inferior que contiene células ATCC PTA-6648 residuales y compuesto residual de fórmula (4) y 2) una fase ligera de disolvente orgánico acuoso enriquecido que contiene el compuesto de fórmula (4). Las centrifugas que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las centrifugas ya descritas anteriormente en el presente documento.

20 Opcionalmente, la fase inferior que contiene las células ATCC PTA-6648 residuales y el compuesto residual de fórmula (4) pueden extraerse adicionalmente con más cantidad de disolvente orgánico y después separarse mediante centrifugación. Las centrifugas que puede utilizarse incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las centrifugas ya descritas anteriormente en el presente documento.

25 Para retirar un color de proceso no deseado, la primera suspensión puede, antes de que se centrifugue, mezclarse opcionalmente con una segunda suspensión que comprende al menos al menos un disolvente orgánico y carbono para producir una tercera suspensión. La segunda suspensión puede prepararse tanto mezclando el carbono con al menos un disolvente orgánico o, si se usa un disolvente orgánico miscible en agua, tal como, por ejemplo, IPA en la preparación de la primera suspensión, el tratamiento de carbono puede realizarse simultáneamente con la extracción.

30 En una realización, el carbono se mezcla con de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 volumen de al menos un disolvente orgánico.

En otra realización, el carbono se mezcla con de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 volúmenes de al menos un disolvente orgánico.

35 En una realización, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20% p/v, basado en la fase pesada o la fase inferior de color claro, de carbono se mezcla con al menos un disolvente orgánico.

En otra realización, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6% p/v, basado en la fase pesada o la fase inferior de color claro, de carbono se mezclan con al menos un disolvente orgánico.

El carbono que puede utilizarse en la preparación de la segunda suspensión incluye, pero sin limitación, por ejemplo, carbono Darco KB.

40 Al menos uno de los disolventes orgánicos que puede utilizarse en la preparación de la segunda suspensión incluye, pero sin limitación, por ejemplo, los disolventes orgánicos ya descritos anteriormente en el presente documento.

45 La tercera suspensión puede centrifugarse adicionalmente para separar la suspensión en una fase inferior que contiene 1) al menos una impureza que incluye, pero sin limitación, por ejemplo, carbono, células ATCC PTA-6648 residuales y compuesto de fórmula (4) residual; y 2) una fase ligera de disolvente orgánico acuoso enriquecido que contiene el compuesto de fórmula (4). Las centrifugas que puede utilizarse incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las centrifugas ya descritas anteriormente en el presente documento.

50 Opcionalmente, la fase inferior que contiene al menos una impureza puede extraerse adicionalmente con más cantidad de disolvente orgánico y después separarse por centrifugación. Las centrifugas que puede utilizarse incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las centrifugas ya descritas anteriormente en el presente documento. El disolvente orgánico que puede utilizarse incluye, pero sin limitación, por ejemplo, los disolventes orgánicos ya descritos anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con los procedimientos de centrifugación, el e.d del compuesto de fórmula (4) presente en la fase ligera

de disolvente orgánico acuoso enriquecido es mayor de el e.d del compuesto de fórmula (4) presente en la suspensión de la mezcla de reacción post-biotransformación.

5 En una realización, el e.d del compuesto de fórmula (4) presente en la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido se incrementa sobre la cantidad presente en la suspensión de mezcla de reacción post-biotransformación de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,5%.

En otra realización, el e.d del compuesto de fórmula (4) presente en la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido se incrementa sobre la cantidad presente en la suspensión de mezcla de reacción post-biotransformación en aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,5%.

10 En otra realización más, el e.d del compuesto de fórmula (4) presente en la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido se incrementa sobre la cantidad presente en la suspensión de mezcla de reacción post-biotransformación en aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5%.

Epoxidación y Cristalización

15 El compuesto de formula (4) puede epoxidarse para dar (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de fórmula (6) mezclando el compuesto de formula (4) con al menos una base, en presencia de al menos un disolvente seleccionado entre un disolvente orgánico polar y un disolvente orgánico polar y agua para producir una mezcla de reacción que comprende el compuesto de fórmula (6). El compuesto de formula (4) puede epoxidarse para dar el compuesto de fórmula (6) tanto directamente después de que se biotransforme a partir del sustrato de fórmula (3) como después de que se separe de la suspensión de mezcla de reacción. El compuesto de fórmula (6) puede retirarse por cristalización de la mezcla de reacción, añadiendo conjuntamente la mezcla de reacción y el agua.

20 En una realización, el compuesto de fórmula (6) es (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano.

Las bases ejemplares que pueden utilizarse en la epoxidación del compuesto de formula (4) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, hidróxidos de metales alcalinos, tales como, por ejemplo, hidróxido de litio, hidróxido sódico e hidróxido potásico; carbonatos de metales alcalinos; hidróxidos de metales alcalinotérreos; carbonatos de metales alcalinos; y combinaciones de los mismos.

25 En una realización, al menos una de las bases es un hidróxido de metal alcalino.

En otra realización, al menos una de las bases es un hidróxido de metal alcalinotérreo.

En otra realización más, al menos una de las bases es un hidróxido de metal alcalino.

En una realización adicional más, al menos una de las bases es hidróxido potásico.

30 Al menos una de las bases puede ser un sólido, una solución acuosa o una suspensión. Típicamente, sin embargo, al menos una de las bases es una solución acuosa. Una base que es una solución acuosa puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 40% a aproximadamente 50% p/p de hidróxido de metal alcalino. En general, se utiliza al menos una cantidad estequiométrica de base.

En una realización, se usan de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 equivalentes de al menos una de las bases en la realización de la epoxidación.

35 En otra realización, se usan de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 equivalentes de al menos una de las bases en la realización de la epoxidación.

En otra realización más, se usan de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,5 equivalentes de al menos una de las bases en la realización de la epoxidación.

40 Los disolventes orgánicos polares ejemplares que pueden utilizarse en la epoxidación del compuesto de formula (4) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, un disolvente aprótico polar, tal como, por ejemplo, acetona, metil etil cetona, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,3-dioxolano, 1,2-dimetoxietano, dimetil éter de dietilenglicol, dimetil éter de trietilenglicol, dimetil éter de tetraetilenglicol, dimetil éter de polietilenglicol, 1,2-dietoxietano, éter dietílico de dietilenglicol, éter dietílico de trietilenglicol, éter dietílico de tetra etilenglicol, éter dietílico de polietilenglicol, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetilsulfóxido; un disolvente orgánico prótico polar, tal como, por ejemplo, un alcohol, tal como, por ejemplo, metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol, *sec*-butanol, isobutanol y *terc*-butanol; y combinaciones de los mismos.

En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar.

En otra realización, el disolvente orgánico prótico polar es alcohol isopropílico.

50 En una realización, al menos uno de los disolventes es un disolvente orgánico polar y agua, y el disolvente orgánico polar tiene una afinidad relativamente alta por el agua.

En otra realización, al menos uno de los disolventes es un disolvente orgánico polar y agua, y el disolvente orgánico polar tiene una alta afinidad por el agua.

5 En otra realización más, al menos uno de los disolventes es un disolvente orgánico polar y agua, y el disolvente orgánico polar es totalmente miscible con el agua. Un disolvente orgánico es, por ejemplo, totalmente miscible con agua cuando la mezcla de disolvente y agua formada después de mezclar el disolvente con el agua es en apariencia homogénea.

10 Una proporción de al menos uno de los disolventes orgánicos con agua cuando se usa una mezcla de un disolvente orgánico polar y agua puede variar dependiendo de factores tales como, por ejemplo, el disolvente orgánico polar empleado en particular, la potencia de al menos una de las bases y la temperatura de reacción. Un experto en la materia, sin embargo, está familiarizado generalmente con experimentos cotidianos para determinar fácil y rápidamente la proporción óptima de disolvente orgánico polar y agua.

En una realización, la proporción de al menos un disolvente orgánico polar a agua es inferior a aproximadamente 10 en volumen.

15 En otra realización, la proporción de al menos uno de los disolventes orgánicos polares a agua es inferior a aproximadamente 5 en volumen.

En otra realización más, la proporción de al menos un disolvente orgánico polar a agua es inferior a aproximadamente 2 en volumen.

20 En una realización en la que el compuesto de fórmula (4) se mezcla con al menos una de las bases después de que se extraiga en la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido, el KF de la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido puede ajustarse antes de que se mezcle con al menos una de las bases. El ajuste del KF puede, por ejemplo, mantener sales y producto en solución durante la reacción de epoxidación.

En una realización, el KF se ajusta a un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 35% p/v, basado en la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido.

25 En otra realización, el KF se ajusta a un intervalo de aproximadamente 24% a aproximadamente 26%, basado en la fase ligera del disolvente orgánico acuoso enriquecido.

En una realización, el KF se ajusta añadiendo agua.

30 El compuesto de fórmula (4) puede mezclarse con al menos una de las bases de acuerdo con un proceso discontinuo, semi-continuo o continuo. En una realización, el compuesto de fórmula (4) y al menos una de las bases se mezclan entre sí en un proceso continuo, en el que se añade una corriente constante del compuesto de fórmula (4) a una corriente constante de al menos una de las bases a una velocidad controlada de manera que aproximadamente 1 a aproximadamente 10, típicamente aproximadamente 1 a aproximadamente 3 y más típicamente aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,5 equivalentes de al menos una de las bases se añaden por mol del compuesto de fórmula (4).

35 La temperatura a la que el compuesto de fórmula (4) puede ponerse en contacto con al menos una de las bases no está particularmente restringida, pero en general la temperatura debería ser tal, que la mezcla de reacción no se solidifique. Por ejemplo, la temperatura es típicamente aproximadamente 50 °C o inferior, y más típicamente de aproximadamente 30 °C o inferior.

En la retirada por cristalización del compuesto de fórmula (6) de la mezcla de reacción, la mezcla de reacción y el agua se añaden conjuntamente.

40 La mezcla de reacción y el agua pueden añadirse conjuntamente de acuerdo con un proceso discontinuo, semi-continuo o continuo.

45 Opcionalmente, la mezcla de reacción y el agua pueden añadirse conjuntamente a una mezcla de cristal de siembra que contiene al menos un cristal de siembra de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido, agua y alcohol isopropílico. En una realización, la mezcla de cristal de siembra contiene aproximadamente una proporción 3:1 de agua:alcohol isopropílico. En otra realización, al menos uno de los cristales de siembra tiene la misma fórmula química que el compuesto de fórmula (6) que se está retirando por cristalización de la mezcla de reacción.

50 La cantidad de al menos uno de los cristales de siembra utilizada depende generalmente de una diversidad de factores, que incluyen, por ejemplo, la velocidad a la que la mezcla de reacción y el agua se añaden conjuntamente. Típicamente, sin embargo, la cantidad de al menos uno de los cristales de siembra usada es al menos aproximadamente 1% en peso en relación al compuesto de fórmula (6) que se está retirando por cristalización de la mezcla de reacción.

Típicamente, la mezcla de reacción y el agua se añaden conjuntamente a una temperatura que permite que se realice la cristalización.

En una realización, la mezcla de reacción y el agua se añaden conjuntamente a una temperatura de aproximadamente 40 °C o inferior.

En otra realización, la mezcla de reacción y el agua se añaden conjuntamente a una temperatura de aproximadamente 20 °C o inferior.

- 5 En otra realización más, la mezcla de reacción y el agua se añaden conjuntamente a una temperatura de aproximadamente 10 °C o inferior.

La temperatura del agua varía típicamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C.

Opcionalmente, puede usarse un intercambiador de calor en línea para enfriar la mezcla de reacción antes de añadir conjuntamente la mezcla de reacción y el agua.

- 10 La mezcla de reacción y el agua pueden añadirse conjuntamente a un cristizador mantenido opcionalmente a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 20 °C, y típicamente a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 °C.

- 15 Según se añaden conjuntamente la mezcla de reacción y el agua, se forma una suspensión que comprende al menos un cristal de fórmula (6). Opcionalmente, la suspensión resultante que comprende al menos uno de los cristales de fórmula (6) puede agitarse moderadamente o agitarse para producir el cristal o cristales de fórmula (6) propiedades satisfactorias y un tamaño de partícula uniforme. Opcionalmente, la suspensión resultante puede calentarse y/o enfriarse para mejorar el rendimiento, calidad y características del cristal o cristales de la fórmula (6).

En una realización, la suspensión que contiene al menos uno de los cristales de la fórmula (6) contiene aproximadamente una proporción 3:1 de agua con al menos uno de los disolventes.

- 20 En otra realización, la mezcla de reacción y el agua se añaden juntos en un proceso continuo, en el que se añade conjuntamente una corriente constante de mezcla de reacción a una corriente constante de agua a una velocidad controlada para producir la suspensión que comprende al menos uno de los cristales de fórmula (6) y aproximadamente una proporción 3:1 de agua con al menos uno de los disolventes.

- 25 Al menos uno de los cristales de fórmula (6) puede separarse de la suspensión mediante cualquier técnica de separación sólido-líquido habitual, tal como, por ejemplo, filtración por presión; filtración a presión reducida; y centrifugación.

Después de que se separen, al menos uno de los cristales de fórmula (6) puede lavarse con agua y, si fuera necesario, secarse posteriormente, por ejemplo, a presión atmosférica, en, por ejemplo, un lecho fluidificado o vacío.

Ejemplos

- 30 La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. La presente invención no se limita por los ejemplos ilustrativos expuestos a continuación en el presente documento, sino que se define por las reivindicaciones posteriores del presente documento.

Ejemplo 1

Producción de cepa PTA-6648 de la ATCC de *Rhodococcus Erythropolis* mutagenizada

- 35 La cepa PTA-6648 de la ATCC de *R. erythropolis* mutagenizada se produjo sometiendo células electrocompetentes 4277 de *R. erythropolis* de la ATCC a un Kit de EZ::TnTM<R6K γ ori/KAN-2>Tnp TransposomeTM adquirido en Epicentre® Biotechnologies (Madison, WI).

- 40 Las células electrocompetentes 4277 de *R. erythropolis* de la ATCC se produjeron de acuerdo con una versión modificada del protocolo expuesto por R. van der Geize y col. in Appl. Environ. Microbiol. 66: 2029-2036 (2000). En primer lugar, 200 ml de caldo trípico de soja alternativo (ATSB) que contiene proteína de soja al 1,8%, extracto de levadura al 0,2%, cloruro de sodio al 0,5%, glucosa al 0,25% y fosfato dipotásico al 0,25% se complementó con glicina al 3,0%. Después el caldo se inoculó con 4,0 ml de 4277 de *R. erythropolis* de la ATCC en cultivo durante una noche y se agitó a 250 RPM a 30 °C hasta una fase exponencial tardía (densidad óptica a 600 nm = 2-3). Después las células 4277 de *R. erythropolis* de la ATCC se sedimentaron centrifugándose durante 10 minutos a 4000 x g.
- 45 gravedad a 4 °C y se lavaron dos veces con agua destilada fría. Después de la centrifugación, el sedimento celular recogido se resuspendió en 2-3 ml de una solución de glicerol al 15%. Alícuotas de 100 μ l de las células electrocompetentes 4277 de *R. erythropolis* de la ATCC se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

- 50 Tras el uso, las células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* electrocompetentes congeladas se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, un μ l de kit EZ::TnTM<R6K γ ori/KAN-2>Tnp TransposomeTM se añadió al tubo Eppendorf de 1,5 ml y se mezcló con las células. La mezcla resultante se transfirió a una cubeta con huecos de 2 mm y se sometió a electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un Electro Cell Manipulator, modelo ECM

630 (BTX Molecular Delivery Systems, Harvard Apparatus Inc., San Diego, CA). La fuerza y resistencia de campo se ajustaron a 1,8 kV/cm y 400 Ω (25 μ F), respectivamente. Se añadió un ml de caldo TSB a la cubeta inmediatamente a continuación de la electroporación y la suspensión celular resultante se transfirió a un tubo de 14 ml de Polipropileno de Fondo Redondo (Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).
 5 El tubo se agitó a 250 RPM a 30 °C durante 4 horas. Alicuotas de 100 μ l de células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* mutagenizadas después se sembraron en placas de agar TSB que contenían 250 μ g/ml de kanamicina. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3-4 días para permitir que se formaran las colonias de las células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* mutagenizadas.

Las colonias de células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* mutagenizadas se recogieron mediante mondadientes estériles y se colocaron en cada pocillo de 2 ml de una placa de 96 pocillos, en la que cada pocillo de 2 ml contenía 400 μ l de TSB y 250 μ g/ml de kanamicina. Después la placa se incubó en una incubadora Microtitertron Orbital Shaking (Appropriate Technical Resources, Inc., Laurel, MD) durante 48 horas a 700 RPM y 30 °C con humedad relativa del 45%. Después se extrajeron cultivos celulares de 40 μ l de cada pocillo y se inocularon en cada pocillo de 2 ml de una placa de 96 pocillos nueva, en la que cada pocillo de 2 ml contenía 400 μ l de TSB y 250 μ g/ml de kanamicina. La placa inoculada recientemente se incubó en una incubadora Microtitertron Orbital Shaking (Appropriate Technical Resources, Inc., Laurel, MD) durante 24 horas a 700 RPM y 30 °C con humedad relativa del 45% y después se centrifugó en una centrífuga Eppendorf, modelo 5810R (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) a 4000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se vació invirtiendo las placas de 96 pocillos cabeza abajo durante 30 segundos. Después las células se resuspendieron en 400 μ l de una solución de reducción enzimática (pH 7,5) que contenía el 0,15% p/v de sustrato de (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano; el 1,0% p/v de glucosa y tampón de tricina 0,1 M. La placa de 96 pocillos se incubó nuevamente en una incubadora Microtitertron Orbital Shaking (Appropriate Technical Resources, Inc., Laurel, MD) durante 24 horas a 700 RPM y 30 °C con humedad relativa del 45% para posibilitar que ocurriera reducción de cetona enzimática del sustrato (3S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano a 1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano en cada pocillo de 2 ml. El contenido de cada pocillo de 2 ml se extrajo posteriormente en volúmenes iguales de una mezcla 3:1 de n-butanol:metanol y se analizó mediante HPLC para determinar bioconversión y pureza diaestereoisomérica. De esta manera se seleccionaron 2500 colonias aisladas.

Cuando el contenido de cada pocillo de 2 ml que contenía cultivos de *R. erythropolis* mutagenizado se analizó, aproximadamente el 90% de los 2500 aislados bioconvirtieron aproximadamente el 100% del sustrato de (3S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano en 1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano, pero produjeron únicamente una e.d., de compuesto (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano deseado de <92%. Se observó que únicamente un aislado tenía un e.d. a favor de compuesto (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano de >98% y este aislado se depositó en la ATCC y se le asignó el n° de ATCC PTA-6648.

35 Ejemplos 2 a 14

Preparación de células PTA 6648 de la ATCC

El cultivo de PTA 6648 de la ATCC del Ejemplo 1 se cultivó hasta una densidad celular elevada con un procedimiento de fermentación semicontinuo usando un cultivo de base de una fase para inocular un recipiente fermentador que contiene un medio discontinuo complejo. En primer lugar, 100 ml de medio de base (pH 7,2) que contiene cerebosa al 0,2% y extracto de levadura al 1% se inoculó con 0,2 ml de reserva de PTA-6648 de la ATCC o cultivo durante una noche. En segundo lugar, el medio de base inoculado se incubó y se agitó en una incubadora Microtitertron Orbital Shaking (Appropriate Technical Resources, Inc., Laurel, MD) durante 22-26 horas a 250 RPM y 28 °C. En tercer lugar, un fermentador B. Braun BioStat B de 5 litros (Sartorius BBI Systems, Inc. Bethlehem, PA) con 1,5 litros de un medio discontinuo complejo (pH 7,0-7,1) que contiene extracto de levadura al 0,3%, glicerol al 0,35%, fosfato dipotásico al 1,2%, ácido cítrico al 0,17%, cloruro de sodio al 0,13%, sulfato de magnesio al 0,18%, sulfato de amonio al 0,046% y propilenglicol al 0,01% se inoculó con 75 ml del medio de base inoculado. Durante la fermentación, se empleó un medio de alimentación concentrado que contenía glicerol al 38%, extracto de levadura 10% y propilenglicol al 0,003% para conseguir densidad celular elevada mientras que se permite la expresión intracelular nativa de la enzima cetorreductasa. A aproximadamente 70-72 horas, que es el punto en el cual se había acumulado una cantidad óptima de enzima cetorreductasa, se recogieron aproximadamente 440 g/l de células. Las células recogidas se lavaron y se diafiltraron con volumen en exceso de cuatro veces de agua a través de una membrana de filtración que tiene un tamaño de poro de 0,2 μ m. El volumen de la mezcla que contiene las células PTA-6648 de la ATCC recogidas se redujo posteriormente para producir una concentración de células en la mezcla de aproximadamente el 40% (p/v).

55 Reacción de biotransformación

Se preparó un sistema acuoso tamponado (pH 7,4) que contenía el 28-32% (p/v) de células PTA-6648 de la ATCC añadiendo tampón de fosfato de sodio 0,1 M, glucosa al 2,2% (p/v), glicerol al 6% (p/v) y la mezcla que contenía aproximadamente el 40% (p/v) de células PTA-6648 de la ATCC preparada anteriormente a un fermentador de 5 litros B. Braun BioStat B. La agitación, temperatura, pH y flujo de aire del fermentador se supervisaron y controlaron

a 1200 RPM, 26 °C, pH 7,4-7,6 y 1 vvm, respectivamente. La producción de espuma se limitó usando antiespuma PPG. Las cantidades de oxígeno disuelto y CO₂ presentes en el sistema acuoso tamponado también se supervisaron y mantuvieron a pO₂≥30.

5 Las fuentes de glucosa y carbono de glicerol se consumieron por las células PTA-6648 de la ATCC durante la biotransformación y como resultado se reabastecieron según era necesario para mantener una concentración de glucosa del 2,2% (p/v) y una concentración de glicerol del 6% (p/v). La glucosa y el glicerol se añadieron para proporcionar energía a las células PTA-6648 de la ATCC.

10 Se añadió un total del 6,0% (p/v) de sustrato (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano como una pasta de glicerol y agua al sistema acuoso tamponado (pH 7,4) que contenía aproximadamente del 28-32% (p/v) de células PTA-6648 de la ATCC como cuatro adiciones separadas del 1,5% (p/v) de (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano. La primera adición se realizó a aproximadamente 0 horas, la segunda a aproximadamente a 4 horas, la tercera a aproximadamente 8 horas y la última a aproximadamente 23 horas. La reacción de biotransformación se terminó en los tiempos expuestos en la Tabla 1 más adelante en el presente documento.

15 De acuerdo con el procedimiento de biotransformación, se biotransformó un total del 6% p/v del sustrato (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano en menos de 72 horas en (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil) con un % de conversión >99,5%, un e.d. >95,5% y una impureza des-cloro de Porcentaje de Área ≤0,5.

20 Los resultados del procedimiento descrito anteriormente se resumen en la Tabla 1 expuesta en el presente documento más adelante.

TABLA 1

Reducción Microbiana Usando PTA-6648 de la ATCC										
Nº de Ej.	Condiciones de Fermentación		Condiciones de Biotransformación					Pureza Diaestereomérica 2R, 3S (%)		Impureza Des-Cloro (% de Área)
	Tiempo (h)	Tiempo (h)	Carga de Sustrato (% p/v)	Células (% p/v)	e.d. (2R, 3S) (%)	% Biotransformado ¹	Pureza Diaestereomérica 2R, 3S (%)	Impureza Des-Cloro (% de Área)		
2	84	24	4	30	95,9	99,7	98,0	N/A ²		
3	84	24	4	30	96,6	99,8	98,3	N/A		
4	72	29	4	30	97,2	>99,8	98,6	0,4		
5	72	29	6	30	97,1	>99,8	98,6	0,5		
6	83	47	6	30	95,0	99,6	97,5	N/A		
7	72	47	6	27	96,1	99,7	98,1	0,5		
8	70	47	6	30	95,8	99,8	97,9	0,3		
9	70	47	6	30	96,0	99,8	98,0	0,4		
10	70	47	6	30	96,1	99,8	98,1	0,2		
11	70	47	6	30	95,8	99,6	97,9	0,2		
12	70	47	6	30	96,0	99,6	98,0	0,4		
13	70	55	6	30	96,8	100	98,4	0,5		
14	70	54	6	30 (+20% extra añadido)	95,7	99,8	97,9	0,3		

1. % Biotransformado=cloroalcoholes totales [(2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano + (2S, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano] ÷ cloroalcoholes totales más (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano restante.

2. "N/A" significa "no aplicable" y se usa para indicar que el parámetro particular no se midió.

Ejemplos comparativos 15 a 22

Preparación de células 4277 de la ATCC de *Rhodococcus erythropolis*

Las células 4277 de la ATCC se prepararon de acuerdo con el procedimiento usado en el Ejemplo 2 para preparar células de PTA-6648 de la ATCC.

5 Reacción de biotransformación

10 Se preparó un sistema acuoso tamponado (pH 8,3) que contenía aproximadamente el 28-32% (p/v) de células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* añadiendo tampón de fosfato de sodio 0,1 M, glucosa al 2,2% (p/v), glicerol al 6% (p/v) y la mezcla que contenía aproximadamente el 40% (p/v) de células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* preparada anteriormente a un fermentador de 5 litros B. Braun BioStat B. La agitación, temperatura, pH y flujo de aire del fermentador se supervisaron y controlaron a 1200 RPM, 26 °C, pH 8,2-8,4 y 1 vvm, respectivamente. La producción de espuma se limitó usando antiespuma PPG. Las cantidades de oxígeno disuelto presente en el sistema acuoso tamponado también se supervisaron.

15 Las fuentes de glucosa y carbono de glicerol se consumieron por las células 4277 de la ATCC de *R. erythropolis* durante la biotransformación y como un resultado se reabastecieron según era necesario para mantener una concentración de glucosa del 2,2% (p/v) y una concentración de glicerol del 6% (p/v). La glucosa y el glicerol se añadieron para proporcionar energía a las células de *Rhodococcus*.

20 El sustrato de (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se añadió como una pasta de glicerol-agua en dos partes iguales a aproximadamente 0 y aproximadamente 4 horas. Por ejemplo, si se usa una carga de sustrato total del 2% (p/v), se añade el 1% (p/v) del sustrato a aproximadamente 0 horas y el 1% (p/v) del sustrato se añade a aproximadamente 4 horas.

Los resultados del procedimiento descrito anteriormente se resumen en la Tabla 2 expuesta en presente documento más adelante.

TABLA 2

Reducción Microbiana Usando 4277 de la ATCC de <i>R. erythropolis</i>										
Nº de Ej.	Condiciones de Fermentación		Condiciones de Biotransformación					Pureza Diaestereomérica 2R, 3S (%)		Impureza Des-Cloro (% de Área)
	Tiempo (h)	Tiempo (h)	Carga de sustrato (% p/v)	Células (% w/v)	e.d. (%)	% Biotransformado ¹	Pureza 3S (%)	Impureza Des-Cloro (% de Área)		
15	72	44	4	30	90,6	44,8	95,3	N/A ²	N/A	
16	72	44	3	30	93,2	66,0	96,6	N/A	N/A	
17	72	24	2	30	92,4	96,7	96,2	N/A	N/A	
18	94	22	2	30	95,6	99,8	97,8	N/A	N/A	
19	94	22	2,5	30	95,5	99,8	97,8	N/A	N/A	
20	94	22	3	30	94,6	99,7	97,3	N/A	N/A	
21	96	22	2	30	96,1	99,5	98,1	2,2	2,2	
22	96	22	2	30	96,4	99,7	98,2	2,1	2,1	

1. % Biotransformado=cloroalcoholes totales [(2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano + (2S, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano] ÷ cloroalcoholes totales más (S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano restante.

2. "N/A" significa "no aplicable" y se usa para indicar que el parámetro particular no se midió.

Ejemplo 23

Cada pasta resultante post-biotransformación de los ejemplos 2, 3, 5, 6, 10, 11 y 14 se centrifugó posteriormente para producir 1) una capa pesada que contenía en su mayoría cristales de (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano y 2) un sobrenadante que contenía en su mayoría impurezas indeseadas, tales como, por ejemplo, propilenglicol; sales; (2S, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano y >70% de las células PTA-6648 de la ATCC.

Para producir la capa pesada, la pasta post-biotransformación de cada uno de los ejemplos 2, 3, 5, 6, 10, 11 y 14 se enfrió en primer lugar hasta 1-5°C (teniendo cuidado de no congelar la pasta) y después se agitó durante 10 minutos. Cada pasta enfriada se separó posteriormente en dos partes iguales y cada parte se añadió a una botella de centrifuga de 750 ml separada. Después ambas partes se centrifugaron en una centrifuga Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Benchtop (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) a 3700 rpm durante 5 minutos. La capa pesada de cada parte se recogió y el sobrenadante que contenía todas las diversas impurezas se descartó.

En centrifugaciones discontinuas, el tamaño de la botella de centrifuga, el volumen de la pasta, la temperatura de la pasta, las rpm de la centrifuga y la longitud de tiempo centrifugada pueden todas afectar las partes de células indeseadas contenidas en la capa pesada y por lo tanto, la cantidad de impurezas eliminadas a través del sobrenadante. La parte de células indeseadas contenidas en la capa pesada también puede influir en el contenido de agua del alcohol isopropílico (IPA KF), lo cual puede conducir a una reducción adicional en la cantidad de impurezas eliminadas a través del sobrenadante.

Cada capa pesada recogida se deshidrató centrifugándose en una centrifuga Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed. Refrigerated Benchtop Centrifuge (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) a 3700 rpm durante 25 minutos. El sobrenadante acuoso resultante (~20 ml) se decantó y cada una de las capas pesadas más secas se examinó.

Tras examinarse, se observó que cada una de las capas pesadas más secas contenía una capa superior de color oscuro y una capa inferior de color claro. La capa superior de color oscuro contenía típicamente en su mayoría células PTA-6648 de la ATCC y <1% en peso, en base a la capa pesada más seca, de (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano. La capa inferior de color claro típicamente contenía en su mayoría (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano; agua y cantidades residuales de células PTA-6648 de la ATCC. Las capas superiores de color oscuro se eliminaron manualmente de las capas pesadas más secas con una espátula. Las capas superiores de color oscuro se combinaron y ensayaron para (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano, cuyos resultados se exponen más adelante en el presente documento en la Tabla 3 en la columna titulada "% e.d. de Capa Superior de Color Oscuro (2R,3S)".

La capa inferior de color claro de cada una de las capas pesadas se añadió junto con 420 ml de alcohol isopropílico (IPA) a un vaso de precipitados único. El contenido del vaso de precipitados se agitó a 25 °C durante 15 minutos para producir una pasta de capa inferior/IPA.

Después 50 ml de IPA se mezclaron con 7,2 g de carbono Darco® KB (American Norit Co., Inc., Atlanta, GA) en un vaso de precipitados para producir una pasta de carbono/IPA. La pasta de carbono/IPA después se añadió a la pasta de capa inferior/IPA. La pasta de capa inferior/carbono/IPA resultante se enjuagó con 10 ml de IPA.

La pasta de capa inferior/carbono/IPA enjuagada se agitó durante al menos 30 minutos a 25 °C y después se centrifugó en una centrifuga Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Benchtop (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) a 3700 rpm durante 15 minutos. La pasta posterior se decantó para separar una primera fase pesada que contenía en su mayoría carbono y células PTA-6648 de la ATCC a partir de una primera fase ligera de IPA acuosa rica que contenía en su mayoría (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano; agua y cantidades residuales de células PTA-6648 de la ATCC. El contenido de agua de la primera fase ligera de IPA acuosa rica (IPA KF) fue del 15-20%.

La primera fase pesada se añadió junto con 120 ml de IPA a un vaso de precipitados. El contenido del vaso de precipitados se agitó durante al menos 30 minutos a 25 °C para producir una pasta. La pasta se centrifugó en una centrifuga Beckman Coulter Allegra® 64R High-Speed Refrigerated Benchtop Centrifuge (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) a 3700 rpm durante 15 minutos. La pasta centrifugada se decantó para separar una segunda fase pesada que contenía en su mayoría carbono y células PTA-6648 de la ATCC a partir de una segunda fase ligera de IPA acuosa rica que contenía en su mayoría (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano; agua y cantidades residuales de células PTA-6648 de la ATCC. El IPA KF de la segunda fase ligera de IPA acuosa rica fue de aproximadamente el 5-9%.

Las dos fases ligeras de IPA acuosas ricas se combinaron en una corriente de fase ligera de IPA acuosa rica única y se sometió a filtración de abrillantado a través de un filtro de 0,45 micrómetros, que se lavó posteriormente con una cantidad mínima de IPA. El IPA KF de la corriente de fase ligera de IPA acuosa rica resultante se ajustó al 25% añadiendo agua. La corriente de fase ligera de IPA acuosa rica se ensayó para (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano, cuyos resultados se exponen en el presente documento más adelante en la

Tabla 3 en la columna titulada “% e.d. de Fase Ligera de IPA Combinada (2R,3S)”.

La segunda fase pesada se ensayó para (2R, 3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano, cuyos resultados se exponen en el presente documento más adelante en la Tabla 3 en la columna titulada “% e.d. de Fase Pesada Residual (2R,3S)”.

- 5 Es importante indicar que aunque a escala de laboratorio la capa pesada recogida se secó a través de una etapa de deshidratación por centrifugación, a escala de planta la etapa de centrifugación de deshidratación se puede eliminar centrifugando la pasta post-biotransformación en un Westfalia Concurrent Extractor-Decanter (Westfalia Separator AG, Oelde, Alemania) para producir directamente una capa pesada suficientemente seca. Adicionalmente, aunque la escala de laboratorio requiere que las capas superior e inferior de la capa pesada seca se separen manualmente, a
- 10 escala de planta la etapa de separación manual se elimina seleccionando simplemente el anillo estando adecuado y optimizando la velocidad diferencial entre el desplazamiento y el cuenco del Westfalia Extractor-Decanter (Westfalia Separator AG, Oelde, Alemania). Es decir, los sólidos de (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se puede separar directamente de las células PTA-6648 de la ATCC ajustando apropiadamente los ajustes del Westfalia Extractor-Decanter (Westfalia Separator AG, Oelde, Alemania).
- 15 El efecto resultante del procedimiento de centrifugación anterior sobre el e.d. del diaestereómero de (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano deseado se expone más adelante en el presente documento en la Tabla 3.

TABLA 3

Uso de centrifugación de IPA para mejorar el E.D. de (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano						
Nº de Ej.	e.d. (%) Post-bioconversión (2R, 3S)	% de Fase ligera de IPA Combinada (2R, 3S) (%)	Aumento en e.d. ¹ (2R, 3S)	e.d. (%) del Sobrenadante (2R, 3S)	e.d. (%) de Capa Superior de Color Oscuro (2R, 3S)	e.d. (%) de Fase Pesada Residual (2R, 3S)
2	95,9	99,0	3,1	17,9	N/A2	98,8
3	96,6	99,0	2,4	23,6	N/A	98,4
5	97,1	99,1	2,0	2,3	86,7	99,1
6	95,0	96,8	1,8	32,5	Na	95,7
10	96,1	97,5	1,4	29,0	58,3	97,4
11	95,8	96,7	0,9	14,3	55,6	96,3
14	95,7	97,6	1,9	13,4	56,9	97,3

1. “% de aumento en e.d. (2R,3S)” = “e.d. (%) de Fase Ligera de IPA Combinada (2R,3S)” – “e.d. (%) Post-bioconversión (2R,3S)”.

2. “N/A” significa “no aplicable” y se usa para indicar que el parámetro particular no se midió.

20 Ejemplo 24

Reacción de epoxidación

- Se convirtió (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano en (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano calentando en primer lugar la corriente IPA rica en (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano del Ejemplo 19 a 30 °C, y después combinando la corriente calentada con
- 25 1,5 equiv. (en relación a la actividad de (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano) de 45% p/p de solución de KOH/agua para formar una mezcla de reacción que contiene (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-butano sustituido. La mezcla de reacción que contiene epóxido se agitó vigorosamente a 30 °C durante 5 minutos y después se enfrió inmediatamente a 5 °C. La mezcla de reacción se ensayó posteriormente para (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano, los resultados del mismo se exponen más
- 30 adelante en el presente documento en la Tabla 4.

(2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano retirado por cristalización

- Se colocaron 400 mg de cristales de siembra de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*terc*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano en un matraz de fondo redondo de 3 l y se añadió una mezcla que contenía 6 ml de agua y 2 ml de IPA al matraz para formar una suspensión de cristal de siembra/agua/IPA. La suspensión se enfrió a 0-5 °C y, mientras se agitaba
- 35 vigorosamente, se añadió conjuntamente una proporción 3:1 antidisolvente frío de agua a 1-5 °C y epóxido que

5 contenía la mezcla de reacción al matraz que contenía el cristal de siembra de manera que provoca so que el (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se retire por cristalización de la mezcla de reacción que contiene epóxido. Es decir, el (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se retira por cristalización de la mezcla de reacción que contiene epóxido, añadiendo conjuntamente agua y la mezcla de reacción que contiene epóxido al matraz que contiene el cristal de siembra a una velocidad tal, que la suspensión resultante comprenda cristales de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano contenidos en una proporción de agua a IPA de aproximadamente 3:1. Después de añadir toda la mezcla de reacción que contiene epóxido, la suspensión se enfrió a 0-5 °C y se agitó suavemente durante 3 horas. Después, la suspensión se filtró a través de un papel de filtro N° 604 de 24 y la torta de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se lavó con 360 ml de agua a 1-5 °C. Los cristales de epóxido de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se secaron al vacío con un arrastre de nitrógeno a 25-30 °C hasta que se obtuvo un peso constante.

10 El procedimiento completo de biotransformación a epoxidación produjo 80,5% en M de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(*tert*-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano.

TABLA 4

Epoxidación de (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano a (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano				
N° de Ej.	Rendimiento en % de M de Cristales Epóxido (2R,3S)	e.d (2R,3S) de ensayo epóxido (%)	e.d de (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano después de centrifugación	Impureza Des-Cloro. después de epoxidación (% de área)
10	80,5	97,4	97,5	0,19%
14(A)	78,4	97,7	97,6	0,15%
14(B)	78,2	97,6	97,6	0,15%

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende preparar (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula:



5 en la que X es a halógeno, R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, y arilo sustituido, y R₁ representa un grupo protector de amino, poniendo en contacto un *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 con de 2,5 a aproximadamente 6% p/v, basado en sustrato, de sustrato de (3S)-1-halo-2-oxo-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula:



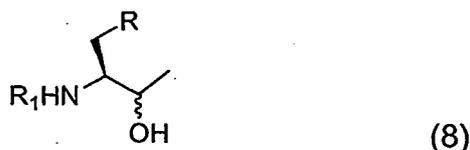
10 en la que X, R, y R₁ son como se han definido anteriormente.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto el sustrato de fórmula (3) con la *Rhodococcus erythropolis* mutagenizada que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 en presencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 6% (p/v) de glicerol.

15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la el compuesto de fórmula (4) se obtiene en un exceso diastereomérico de al menos el 95,6%.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el compuesto de fórmula (4) se obtiene a una pureza diastereomérica de al menos el 97,9%.

20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la puesta en contacto del *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene un N° de depósito de ATCC PTA-6648 con el sustrato de fórmula (3) produce menos de aproximadamente el 0,6 por ciento de área de impureza des-halo alcohol de (3S)-2-hidroxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula



en la que R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo o arilo sustituido y R₁ representa un grupo protector de amino.

25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la impureza del des-halo alcohol es ((1S)-1-bencil-2-hidroxipropil)carbamato de *tert*-butilo.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además la utilización de la centrifugación para separar el compuesto de fórmula (4) de al menos una impureza.

30 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha centrifugación provoca un incremento en el exceso diastereomérico del compuesto de fórmula (4) de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,5%.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 se pone en contacto con de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6% p/v, basado en sustrato, de sustrato de fórmula (3).

35 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además poner en contacto el sustrato de fórmula (3) con el *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 en

presencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 6% (p/v) de glicerol.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que al menos el 99,6% del sustrato de fórmula (3) se biotransforma para dar el compuesto de fórmula (4).

5 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el compuesto de fórmula (4) se obtiene en un exceso diastereomérico de al menos aproximadamente el 95,1%.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el compuesto de fórmula (4) se obtiene a una pureza diastereomérica de al menos aproximadamente el 96%.

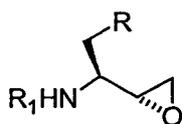
10 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 se pone en contacto con aproximadamente 6% p/v, basado en sustrato, del sustrato de fórmula (3).

15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es cloro, R es fenilo y R₁ es terc-butoxicarbonilo.

16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la utilización de la centrifugación para separar el compuesto de fórmula (4) de al menos una impureza.

15 17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicha centrifugación provoca un incremento en el exceso diastereomérico del compuesto de fórmula (4) de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,5%.

18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además mezclar el compuesto de fórmula (4) con al menos una base en presencia de al menos un disolvente seleccionado ente un disolvente orgánico polar y un disolvente orgánico polar y agua para producir una mezcla de reacción que comprende (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula



(6)

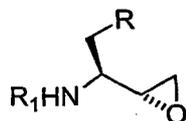
20 en la que R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo o arilo sustituido y R₁ representa un grupo protector de amino.

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que R es fenilo y R₁ es terc-butoxicarbonilo.

25 20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende además retirar por cristalización el compuesto de fórmula (6) de la mezcla de reacción añadiendo conjuntamente agua y la mezcla de reacción juntas.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la adición conjunta de agua y la mezcla de reacción juntas produce una suspensión que comprende al menos un cristal de fórmula (6) y una proporción del agua con el menos uno de los disolventes de de aproximadamente 3:1.

30 22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además mezclar el compuesto de fórmula (4) con al menos una base en presencia de al menos un disolvente seleccionado entre un disolvente orgánico polar y un disolvente orgánico polar y agua para producir una mezcla de reacción que comprende (2R,3S)-1,2-epoxi-3-(protegido)amino-4-butano sustituido de la fórmula



(6)

35 en la que R se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo o arilo sustituido y R₁ representa un grupo protector de amino.

23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que R es fenilo y R₁ es *terc*-butoxicarbonilo.

24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende además retirar por cristalización el compuesto de fórmula (6) de la mezcla de reacción añadiendo conjuntamente agua y la mezcla de reacción juntas.

40 25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicha adición conjunta del agua y la mezcla de reacción juntas produce una suspensión que comprende al menos un cristal de fórmula (6) y una proporción del agua con al menos uno de los disolventes de aproximadamente 3:1.

26. Un *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648.

27. Un procedimiento que comprende preparar (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano poniendo en contacto un *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 con de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6% p/v, basado en sustrato, de sustrato de (3S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano.

5

28. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el sustrato de (3S)-1-cloro-2-oxo-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano se pone en contacto con el *Rhodococcus erythropolis* mutagenizado que tiene N° de depósito de ATCC PTA-6648 en presencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 6% (p/v) de glicerol.

29. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende además mezclar el (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano con de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 equivalentes de hidróxido potásico en presencia de alcohol isopropílico para producir una mezcla de reacción que comprende (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano; y retirar por cristalización dicho (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano de la mezcla de reacción añadiendo conjuntamente agua y la mezcla de reacción juntas para producir una suspensión que comprende al menos un cristal de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano y una proporción de agua con el alcohol isopropílico de aproximadamente 3:1.

10

15

30. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende además la utilización de la centrifugación para separar el (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano de al menos una impureza.

31. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 30, que comprende además mezclar el (2R,3S)-1-cloro-2-hidroxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano con de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 equivalentes de hidróxido potásico en presencia de alcohol isopropílico para producir una mezcla de reacción que comprende (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano; y cristalizar dicho (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano de la mezcla de reacción añadiendo conjuntamente agua y la mezcla de reacción juntas para producir una suspensión que comprende al menos un cristal de (2R,3S)-1,2-epoxi-3-N-(terc-butoxicarbonil)amino-4-fenilbutano y una proporción del agua con el alcohol isopropílico de aproximadamente 3:1.

20