

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 243**

51 Int. Cl.:

C07D 211/70 (2006.01)

C07D 211/44 (2006.01)

C07D 211/22 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2001 E 08005953 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **20.08.2008 EP 1958935**

54 Título: **Proceso para la producción de derivados de la terfenadina y carebastina con microorganismos.**

30 Prioridad:

08.11.2000 US 708959

04.01.2001 US 754786

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.02.2013

73 Titular/es:

**ALBANY MOLECULAR RESEARCH, INC. (100.0%)
26 CORPORATE CIRCLE
ALBANY, NY 12203-0289, US**

72 Inventor/es:

**MICHELS, PETER C. y
ZIRBES, ERIC L.**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 243 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

Campo de la invención

[0001] La presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción de derivados de piperidina con microorganismos.

5 ANTECEDENTES de la invención

[0002] La terfenadina, 1-(p-terc-butilfenil)-4-[4'-(α -hidroxidifenilmetil)-1'-piperidinil]-butanol, es un anti-histamínico no-sedante. Se informa que el es un receptor H¹ específico antagonista que está también carente de cualquier anticolinérgico, antiserotoninérgico, y de efectos anti-adrenérgicos in vitro e in vivo. Ver *D. Mc.Tavish, K.L. Goa, M. Drugs, 1990, 39, 552; C.R Kingsolving, N.L. Monroe, A.A Carr, Pharmacologist, 1973, 15,221; J.K. Woodward, N.L. Munro Arzneim-Forsch, 1982, 32,1154; K.V. Marm, K.J. Tietze, Clin._Pharm. 1989, 6, 331.* Se ha hecho un gran esfuerzo en investigar la relación estructura - actividad de los análogos de la terfenadina y ésta se refleja en el gran número de patentes de EE.UU. que revelan este compuesto y las estructuras asociadas como sigue:

Patente de EE.UU. No. 3,687,956 de Zivkovic

Patente de EE.UU. No. 3,806,526 de Carr, et. al.

15 Patente de EE.UU. No. 3,829,433 de Carr, et. al.

Patente de EE.UU. No. 3,862,173 de Carr, et al.

Patente de EE.UU. No. 3,878,217 de Carr, et al.

Patente de EE.UU. No. 3,922,276 de Duncan, et al.

Patente de EE.UU. No. 3,931,197 de Carr, et. al.

20 Patente de EE.UU. No. 3,941,795 de Carr, et al.

Patente de EE.UU. No. 3,946,022 de Carr, et al.

Patente de EE.UU. No. 3,956,296 de Duncan, et al.

Patente de EE.UU. No. 3,965,257 de Carr, et. al.

Patente de EE.UU. No. 4,742,175 de Fawcett, et. al.

25 [0003] En estudios metabólicos en animales y humanos, se ha observado que la terfenadina experimenta un extenso metabolismo hepático de primer paso, y, tras dosis normales, no puede ser detectada en el plasma a menos que se usen ensayos muy sensibles. Una enzima específica del citocromo hepático P-450 convierte la terfenadina en el metabolito principal, ácido 4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxi-butil- α - α -dimetilfenilacético, también conocido como metabolito ácido carboxílico de terfenadina. Este metabolito puede ser fácilmente detectado en el plasma y se considera la forma activa de la terfenadina administrada oralmente.

30 [0004] Los efectos secundarios reportados con la terfenadina son arritmias cardíacas (taquiarritmias ventriculares, torsados de pointes, fibrilación ventricular), sedación, dolor GI, sequedad bucal, estreñimiento y/o diarrea. El más serio de éstos, y potencialmente mortal, son las arritmias cardíacas, que están relacionadas con la capacidad de la terfenadina para prolongar el intervalo QT cardíaco, y son solamente reportados en pacientes con enfermedad del hígado a quienes se les ha administrado terfenadina o que toman también el fármaco antifúngico ketoconazol o el antibiótico eritromicina.

35 [0005] Como los efectos secundarios cardíacos de la terfenadina han sido reportados en pacientes con función hepática dañada y en pacientes que también toman antibióticos conocidos por suprimir la función de la enzima hepática, se especuló que los efectos secundarios cardíacos eran debidos a la acumulación de la terfenadina y no a la acumulación del metabolito ácido carboxílico de terfenadina. Estudios de parche de membrana en miocitos ventriculares aislados de felinos respaldan el argumento de que la terfenadina, y no el metabolito ácido carboxílico, es el responsable de los efectos secundarios cardíacos. A una concentración de 1 μ M, la terfenadina causa más del 90% de la inhibición del retraso en el flujo del potasio rectificador. A concentraciones de hasta 5 μ M, el metabolito ácido carboxílico de terfenadina no tuvo ningún efecto importante sobre el flujo del potasio en este ensayo (Ver *R.L. Woosley, Y. Chen, J.P.. Frieman, y R.A. Gillis, JAMA 1993, 269, 1532*). Debido a que la inhibición del transporte de iones se ha vinculado a anomalías cardíacas, tales como las arritmias, estos resultados indican que probablemente el ácido carboxílico de la terfenadina no es responsable de causar arritmias cardíacas a niveles de dosis en los que hay un claro riesgo de que la propia terfenadina cause este efecto secundario.

[0006] La carebastina, ácido 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-oxobutil]- α,α -dimetilfenilacético, es el metabolito ácido carboxílico de ebastina, 1-(p-terc-butilfenil)-4-[4'-(α -difenilmetoxi)-1'-piperidinil]-butanol. Ambos compuestos poseen potentes propiedades de bloqueo selectivo del receptor H₁ de histamina y de antagonista de calcio y se han visto de utilidad en el tratamiento de una variedad de estados de enfermedades respiratorias, alérgicas y cardiovasculares.

5 [0007] Estos compuestos relajan el músculo bronquial y vascular liso in vitro e in vivo e inhiben la influencia constrictora de la noradrenalina, los iones de potasio, y varias otros fármacos agonistas. Los compuestos también inhiben las respuestas de preparaciones intestinales y traqueales a la histamina, acetilcolina, y al cloruro de bario y obstruyen la broncoconstricción producida por aerosol de histamina en cobayas en dosis menores de 1 mg/kg de peso corporal del animal administrado oralmente. También poseen propiedades antianafilácticas en la rata, inhiben las lesiones de la piel a una variedad de mediadores anafilácticos (histamina, 5-hidroxitriptamina, bradikina, LCD4, etcétera), y antagoniza la respuesta sensitiva Schultz-Dale en cobayas.

[0008] Los derivados de piperidina relacionados con el metabolito ácido carboxílico de terfenadina son revelados en las siguientes patentes de EE.UU.:

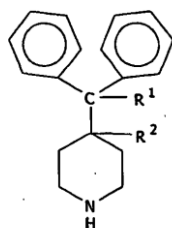
Patente de EE.UU. No. 4,254,129 de Carr, et. al.

15 Patente de EE.UU. No. 4,254,130 de Carr, et. al.

Patente de EE.UU. No. 4,285,957 de Carr, et. al.

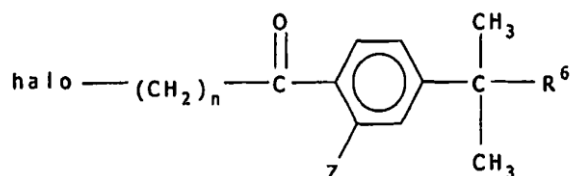
Patente de EE.UU. No. 4,285,958 de Carr, et. al.

En estas patentes, el ácido 4-[4-[4-(hidroxdifenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]- α,α -dimetilbencenoacético y los compuestos relacionados se preparan por alquilación de un derivado de una piperidina sustituida de la fórmula:



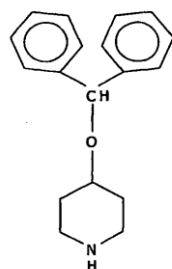
20

con una fenilcetona α -haloalquil sustituida de la fórmula:

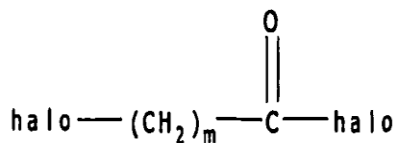


en donde los sustituyentes halo, R¹, R², n, Z, y R⁶ se describen en la columna 6 de la Patente de EE.UU. No. 4,254,130.

25 [0009] De modo similar, la Patente de EE.UU. No. 4,550,116 de Soto et al. describe la preparación de derivados de piperidina relacionados con la carebastina mediante la reacción de la fenilcetona α -haloalquil sustituida con un derivado de hidroxipiperidina sustituido de la fórmula:



30 [0010] La Patente de EE.UU. No. 4,254,130 indica que las fenilcetonas α -haloalquil sustituidas, en donde Z es hidrógeno, se preparan reaccionando un éster de alquilo C₁₋₆ inferior lineal o ramificado apropiado de ácido α,α -dimetilfenilacético con un compuesto de la siguiente fórmula:



en condiciones generales de una acilación de Friedel-Crafts, donde halo y m son descritos en la columna 11 de la Patente de EE.UU. No.4,254,129. La reacción es llevada a cabo en disulfuro de carbono como disolvente preferido.

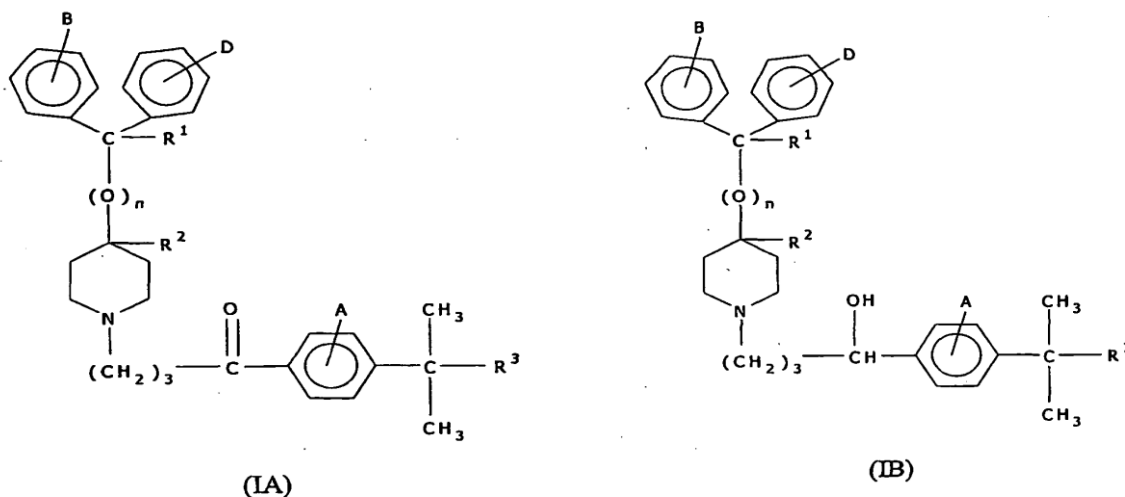
5 [0011] En la Patente de EE.UU. No. 5,578,610, 5,581,011, 5,589,487, 5,663,412, 5,750,703 y 5,994,549, así como en las solicitudes de PCT Nos. WO95/00492, WO94/03170 y WO95/00480 se revelan otros procedimientos para producir sintéticamente el metabolito ácido carboxílico de terfenadina.

10 [0012] Otro enfoque para producir compuestos del metabolito ácido carboxílico de terfenadina involucra la conversión de compuestos tipo terfenadina usando hongos. Este procedimiento es revelado en la Patente de EE.UU. No. 5,204,249 de Schwartz *et. al.* y la Patente de EE.UU. No. 5,990,127 de Meiwes *et. al.* En la patente de Schwartz, los hongos del género *Cunninghamella* se usan para convertir ebastina en carebastina. La patente de Meiwes emplea especies de hongos de los géneros *Cunninghamella* y *Absidia* para transformar la terfenadina en su metabolito ácido. Aunque estos procedimientos se han encontrado útiles en la producción de compuestos semejantes al metabolito ácido carboxílico de terfenadina, el rendimiento inicial de los productos de tales procedimientos es muy bajo y la restricción a hongos de filamentos, de los géneros previamente indicados, crea limitaciones no deseables para un procedimiento comercialmente viable.

15 [0013] La presente invención está dirigida a un procedimiento mejorado para la preparación de derivados del metabolito ácido carboxílico de terfenadina y de carebastina usando catalizadores microbianos.

Resumen de la invención

20 [0014] La presente invención se refiere a la producción de un compuesto de producto que tiene las Fórmulas IA y/o IB:



donde

n es 0 ó 1;

R¹ es hidrógeno o hidroxilo;

R² es hidrógeno;

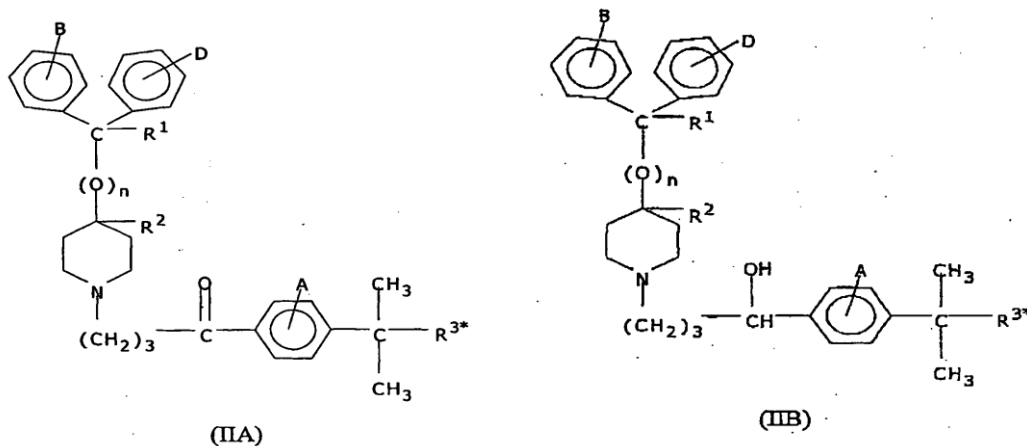
25 o, cuando n es 0, R¹ y R² tomados juntos forman un segundo enlace entre los átomos de carbono que tienen R¹ y R², siempre que cuando n es 1, R¹ y R² sean cada uno hidrógeno;

R³ es -COOH o -COOR⁴;

R⁴ es una fracción de alquilo o arilo;

A, B, y D son los sustituyentes de sus anillos, cada uno de los cuales puede ser diferente o el mismo, y son seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, halógenos, alquilo, hidroxilo y alcoxi.

[0015] Este procedimiento supone incubar un compuesto inicial de las Fórmulas IIA y/o IIB:



5 donde R^{3*} es $-CH_3$ y R^1 , R^2 , A, B, y D son definidos anteriormente,

en presencia de un microorganismo en condiciones eficaces para producir el compuesto de producto. El microorganismo puede ser del género *Bacillus*, o *Pseudomonas*.

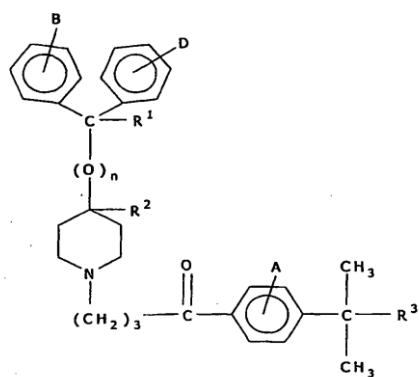
10 [0016] La presente invención proporciona un procedimiento alternativo y/o mejorado para la preparación de carboxiterfenadina a partir de terfenadina. La selectividad y los rendimientos de la carboxiterfenadina obtenida usando las cepas y procesos según la presente invención pueden ser más altos que los obtenidos usando las cepas conocidas. Además, la identificación de muchas cepas, especialmente cepas bacterianas (gram negativas), para la conversión objetivo, puede permitir ventajas significativas de mejora de cepas, procesos y fabricación respecto a las cepas fúngicas filamentosas anteriormente usadas.

15 [0017] de forma importante y sorprendente, *Bacillus* y *Pseudomonas* representan cepas eubacterianas gram negativas, un reino enteramente diferente de los hongos filamentosos previamente identificados para realizar la transformación objetivo. Las técnicas para mejora de cepas y manipulación genética de cepas bacterianas, incluyendo especialmente *Bacillus* y *Pseudomonas* son considerablemente más simples y mejor establecidas en comparación con los hongos, tales como las cepas *Cunninghamella*. Además, el procesamiento a escala comercial de microorganismos no filamentosos, incluyendo hongos no filamentosos, levaduras, y eubacterias, proporciona muchos procesos de fermentación y purificación adicionales y más económicos que los que son posibles para los hongos filamentosos solos.

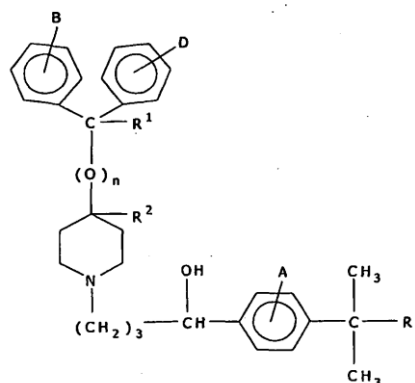
20 [0018] Aún más, la variedad de biocatalizadores microbianos permite la transformación a una amplia variedad de variaciones estructurales. Adicionalmente, la identificación de múltiples cepas que poseen genes y enzimas útiles para tal transformación es un requisito importante para el uso de técnicas biológicas moleculares modernas para la optimización adicional de microorganismos como catalizadores industriales para la producción de derivados de piperidina.

Descripción detallada de la invención

25 [0019] La presente invención se refiere a la producción de un compuesto de producto que tiene una estructura de acuerdo con las Fórmulas IA y/o IB:



(IA)



(IB)

donde

n es 0 ó 1;

R¹ es hidrógeno o hidroxilo;

R² es hidrógeno;

5

o, cuando n es 0, R¹ y R² tomados juntos forman un segundo enlace entre los átomos de carbono que llevan R¹ y R², siempre que cuando n es 1, R¹ y R² sean cada uno hidrógenos;

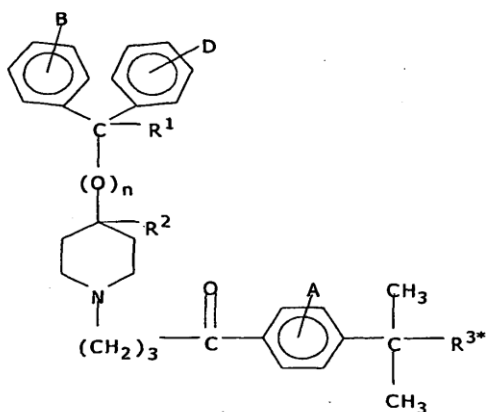
R³ es -COOH o -COOR⁴;

R⁴ es un alquilo o fracción de arilo;

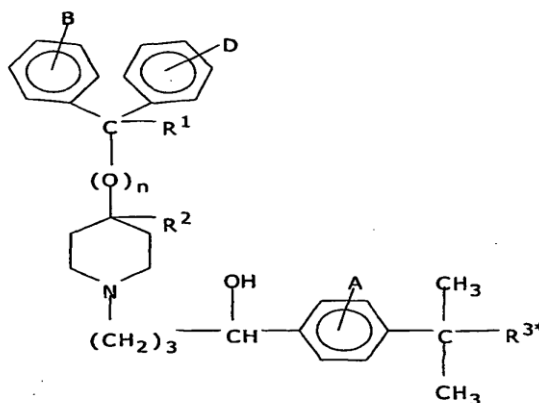
10

A, B, y D son los sustituyentes de sus anillos, cada uno de los cuales puede ser diferente o el mismo, y son seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, halógenos, alquilo, hidroxilo y alcoxi.

[0020] Este procedimiento supone incubar un compuesto inicial que tiene una estructura de acuerdo con las Fórmulas IIA y/o IIB:



(IIA)



(IIB)

15

en donde R³ es -CH₃ y R¹; R², A, B, y D son definidos arriba, en presencia de un microorganismo bajo condiciones efectivas para producir el compuesto del producto. El microorganismo puede ser del género *Bacillus* o *Pseudomonas*.

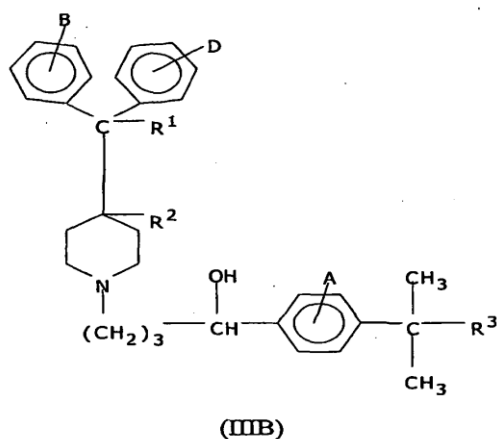
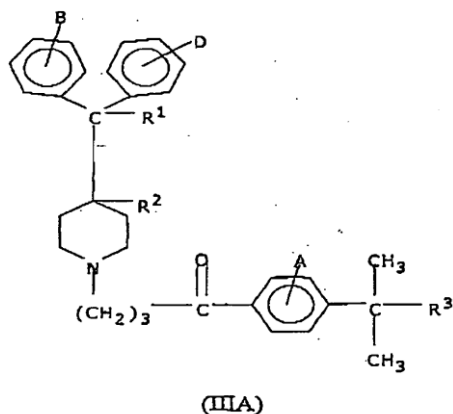
20

[0021] El procedimiento de la presente invención es llevado a cabo en un medio de crecimiento líquido. Lo que constituye un medio de crecimiento apropiado depende del microorganismo específico y el propósito, como es sabido por los expertos en la técnica. En general, el medio de crecimiento contiene fuentes de carbono, como dextrosa, sacarosa, citrato, y/o almidón, y fuentes de nitrógeno, como harina de soja, extracto de levadura, triptona, extracto de malta y/o acetato de amonio. Además, el medio de crecimiento contiene sales inorgánicas, como fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, sulfato de calcio, carbonato de calcio, y/o sulfato de magnesio, y elementos de traza, como hierro, zinc, cobre, molibdeno, manganeso, u otras sales de metal.

- [0022] Los microorganismos usados en la presente invención pueden seleccionarse de los géneros *Bacillus* o *Pseudomonas*. Respecto al género *Bacillus*, las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus fusiformis* pueden usarse para llevar a la práctica el proceso de la presente invención. Especies útiles de *Pseudomonas* incluyen *Pseudomonas putida*.
- 5 [0023] Para cada cepa, la invención se refiere al uso de todo el microorganismo, y sus componentes, incluyendo, pero sin limitarse a, extractos de células, microsomas, enzimas aisladas, y genes, para la oxidación quimio y regioselectiva de las Fórmulas IIA y/o IIB para productos de las Fórmulas IA y/o IB.
- [0024] Además, mutantes y seleccionados de los microbios de los géneros listados y especialmente los de las cepas específicas aquí descritas son también apropiados para el uso en el procedimiento de la presente invención. Los mutantes pueden ser creados por métodos clásicos de mutagénesis para la mejora de la cepa, como mutagénesis aleatoria mediada por sustancias químicas u ondas electromagnéticas, o por métodos modernos de manipulación genética, como PCR con predisposición a errores, mutagénesis de codones, o transposiciones genéticas.
- 10 [0025] Adicionalmente, se ha identificado también que cepas microbianas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* oxidan terfenadina a carboxiterfenadina en rendimientos mayores que 3% sin optimización. En experimentación previa, *Meiwes et al* identificaron solamente dos cepas que produjeron rendimientos del 3% o más mayores durante la prueba inicial.
- [0026] Todos estos microorganismos están libremente disponible en colecciones de cultivo públicas. La identidad y fuente específicas de los cultivos microbianos se describen en los ejemplos de abajo.
- [0027] Los cultivos microbianos usados para la presente invención pueden ser mantenidos de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos, tales como en medios sólidos, conservados en aceite mineral y liofilizados o congelados.
- 20 [0028] Los cultivos microbianos pueden ser mantenidos en un medio sólido apropiado, tal como 30 gramos/litro de caldo de dextrosa sabouraud y 20 gramos/litro de agar. Preferentemente, para algunas cepas, la preparación de inóculos incluyendo una temperatura baja de crioconservación y técnica de descongelación (i.e. técnica de "*Cryoready*") sirve para mejorar el enfoque para transformar el material inicial en el producto de piperidina de la presente invención reduciendo el tiempo requerido para producir inóculos apropiados y aumentar la producción del producto de piperidina. Tras desarrollar el cultivo en un medio líquido apropiado, la suspensión microbiana es centrifugada, el medio líquido utilizado es eliminado, y el gránulo concentrado de células es resuspendido con un volumen igual de glicerol al 20% estéril estándar y de caldo fresco, para producir una suspensión de células en glicerol al 10%.
- 25 [0029] De un medio sólido, los microorganismos son propagados inicialmente a través de una o más etapas en un medio de cultivo líquido neutro apropiado para mantener el crecimiento de las cepas específicas (i.e. el procedimiento "Multipaso"). El medio típico para la propagación inicial consta de 20 g/l de glucosa, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/L de levadura de harina de soja, 5 g/l de NaCl, y 5g/l de K₂ HPO₄. La etapa inicial de los cultivos microbianos fue incubada a 29°C y 250 rpm durante 48 o 72 horas. Las etapas siguientes fueron inoculadas, con un inóculo pesado (1-20% v/v, especialmente 10% v/v de la suspensión microbiana del estado previo del cultivo líquido, en un medio líquido fresco.
- 30 [0030] Para la etapa de reacción, un inóculo pesado (1-20% v/v, especialmente 10% v/v) de la suspensión microbiana, o de células crioconservadas descongeladas es inoculado en un medio fresco. Los microorganismos son cultivados a temperaturas entre aproximadamente 20 y 80 °C, preferentemente 25 a 37 °C, y a pH de 4 a 9, especialmente entre pH 5 y 8, dependiendo del microorganismo específico usado para la transformación. La incubación de los microorganismos fue llevada a cabo durante un intervalo de tiempo de 2-240 horas, preferentemente de 75 a 170 horas. La reacción fue realizada aeróbicamente, inicialmente en cámaras de reacción multipocillos paralelas, constantemente alimentadas de aire u oxígeno enriquecido, y agitadas. Seguidamente, se pueden realizar fermentaciones a mayor escala de un modo similar en matraces de agitación, y luego en fermentadores con agitador y aireación.
- 35 [0031] La adición del material inicial para el cultivo microbiano se hace entre 0-72 horas de la inoculación del medio de reacción con inóculo preparado, preferentemente después de aproximadamente 8-48 horas y especialmente después de 24 horas de incubación. La adición de material de inicio es realizada más convenientemente de una solución de un disolvente orgánico apropiado, pero también puede ser añadido como polvo sólido, o como suspensión. De la solución, el material de inicio es añadido preferentemente en dimetilformamida (DMF), pero también en etanol, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF) y, una formamida (i.e. dibutil-, diisopropil-, o dietil-), una pirrolidona (i.e. 1-metil-, 1-etil-, 1 ciclohexil-), 4-formil-molfolina, 1-formilpiperidina, 1-formilpirrolidina, tetrametil-tetraetil-, tetrabutilurea, un óxido de fosfina (i.e. tripiperidino- o tripirrolidino), sulfolano, N-metil-caprolactamo, o mezclas de éstos. Solubilizadores biocompatibles orgánicos, como ciclodextrinas o surfactantes (e.g. Tween 80 o Pluronic F38) también pueden ser añadidos a un medio de reacción que contenga el microorganismo.
- 45 [0032] Los compuestos de la Fórmula IA y/o IB pueden ser aislados directamente del caldo microbiano o de líquido clarificado después de la separación de las células, por ejemplo, por centrifugación o filtración. Estos productos pueden ser aislados por extracción con disolventes orgánicos o por adsorción sobre resinas hidrofóbicas o intercambiadores de iones.
- 50
- 55

[0033] Variaciones adicionales de esta invención pueden usar los microorganismos de las realizaciones y técnicas estándares y procedimientos convencionales para incubar los microorganismos y dirigir las reacciones, como expuestas en manuales generalmente adecuados. Por ejemplo, los métodos descritos en *Demain, AL. y J.E. Davies, Manual de Microbiología Industrial y Biotecnología, 2nd Ed. (1999)* y *Crueger, W y A. Crueger, Biotecnología: un libro de texto de Microbiología Industrial (1984)* son aplicables para la preparación de los cultivos y para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

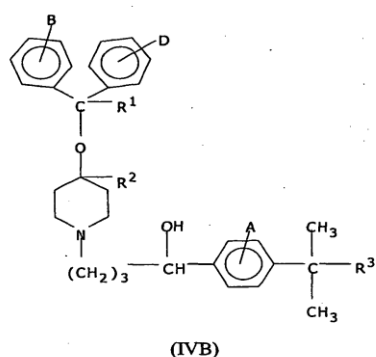
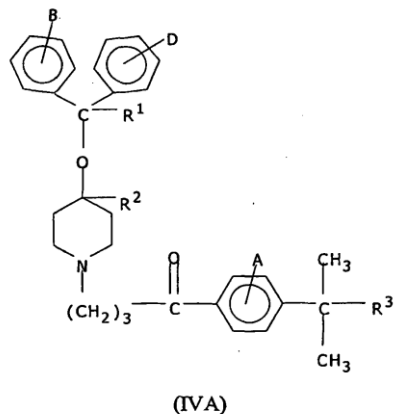
[0034] De particular importancia son los compuestos de las Fórmulas IIIA y/o IIIB:



en donde R¹, R², R³, A, B, y D son definidos arriba. De estos compuestos, se prefiere particularmente el ácido 4-(4-(4-hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil)-1-hidroxibutil)-α,α-dimetilfenil-acético.

[0035] Otra clase de compuestos preferidos son los compuestos de las Fórmulas IVA y/o IVB:

10



15

en donde R¹, R², R³, A, B, y D son definidos arriba. De estos compuestos, es particularmente preferido el ácido 4-[4-[4-difenilmetoxi]-1-piperidinil]-oxobutil)-α,α-dimetilfenil-acético.

20

[0036] La presente invención adicionalmente se relaciona con un procedimiento para la preparación de análogos adicionales de las Fórmulas IA y/o IB a partir de estructuras de acuerdo con las Fórmulas IIA y o IIB, con un microorganismo de acuerdo con la presente invención.

[0037] Otros ejemplos ilustrativos de compuestos preparados por el procedimiento de la presente invención son como sigue:

25

ácido α,α-4-[4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxibutil]-dimetilbenceno acético

ácido α, α-4-[4-[4-(difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxibutil dimetilbenceno acético;

ácido α, α-4-[4-[4-(difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxibutil dimetilbenceno acético;

ácido α,α-4-[4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxibutil]-dimetil-3-hidroxi benceno acético;

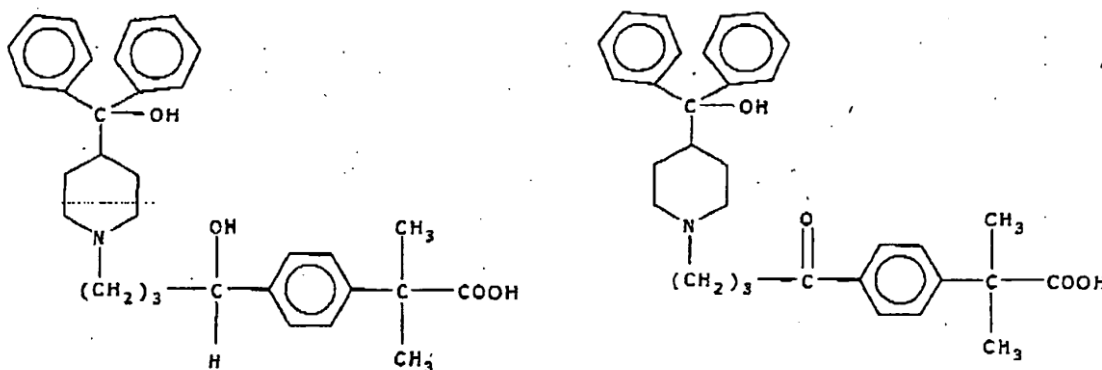
30

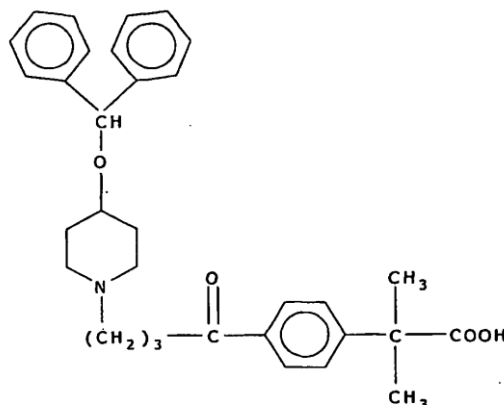
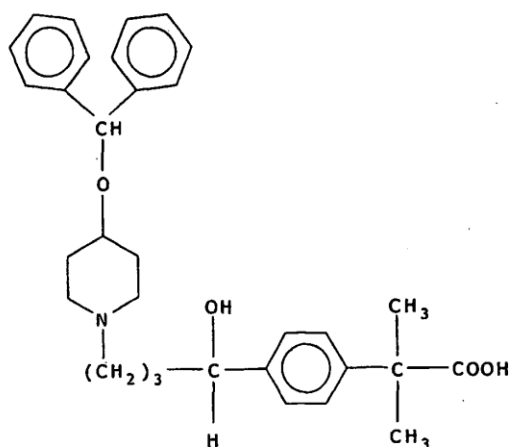
ácido α, α 4-[4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxibutil]-dimetil-2-hidroxibenceno acético;

- ácido α , α 4-[4-[4-(difenilmetileno)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-3-hidroxi-benceno acético;
- ácido α , α -4-[4-[4-(difenilmetileno)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-benceno acético;
- α , α -dimetil-bencenoacetato 4-[4-[4-(hidroxi-difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil] de etilo;
- α , α -dimetil-bencenoacetato 4-[4-[4-(difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil] de n-pentilo;
- 5 α , α -dimetil-bencenoacetato 4-[4-[4-(difenilmetileno)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil] de etilo
- α , α -dimetil-bencenoacetato 4-[4-[4-(hidroxi-difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de metilo;
- α , α -dimetil-3-hidroxi-bencenoacetato 4-[4-[4-(hidroxi-difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de etilo;
- α , α -dimetil-2-hidroxi-bencenoacetato 4-[4-[4-(hidroxi-difenilmetil)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil] de n-propilo;
- α , α -dimetil-3-hidroxi-bencenoacetato 4-[4-[4-(difenilmetileno)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil] de n-hexilo;
- 10 α , α -acetato de dimetil-benceno 4-[4-[4-(difenilmetileno)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de etilo;
- α , α -ácido 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-benceno acético;
- ácido α , α -4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-3-hidroxi-benceno acético;
- ácido α , α -4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-2-hidroxi-benceno acético;
- ácido α , α -4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-3-hidroxi-benceno acético;
- 15 ácido α , α -4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-dimetil-benceno acético;
- α , α -dimetil-bencenoacetato 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de n-pentilo;
- α , α -dimetil-bencenoacetato 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de etilo;
- α , α -dimetil-(3-hidroxi-benceno)acetato 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de etilo;
- α , α -dimetil-(2-hidroxi-benceno)acetato 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de n-propilo;
- 20 α , α -dimetilo-(3-hidroxi-benceno)acetato 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de n-hexilo; y
- α , α -dimetil-benceno acetato 4-[4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-hidroxiutil]-de etilo.

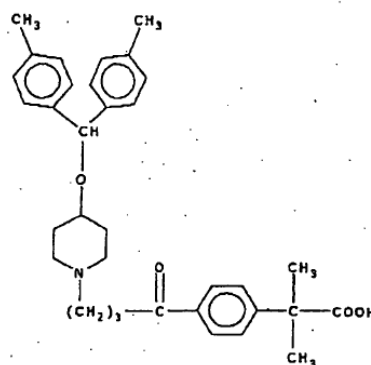
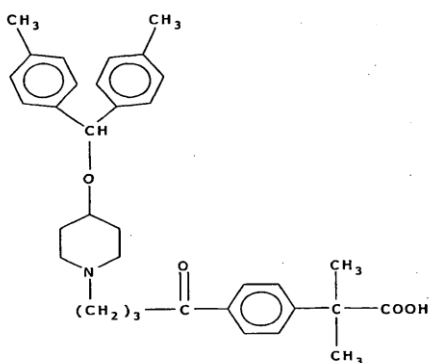
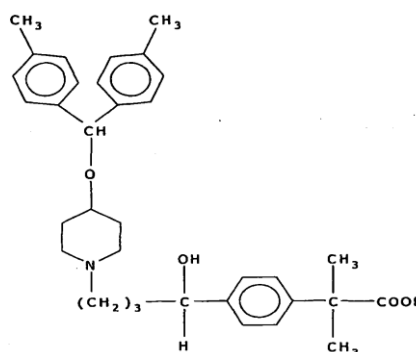
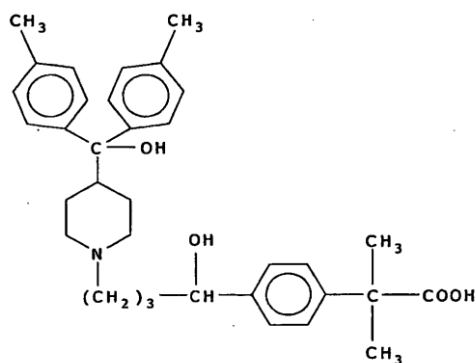
[0038] La presente invención se relaciona adicionalmente con un procedimiento para la preparación de análogos adicionales de las Fórmulas IA y/o IB a partir de estructuras de acuerdo con las Fórmulas IIA y o IIB, con *Bacillus* o *Pseudomonas* usado de acuerdo con el procedimiento (o un procedimiento esencialmente equivalente) expresado aquí.

25 [0039] Particularmente preferidos son los compuestos de las fórmulas:

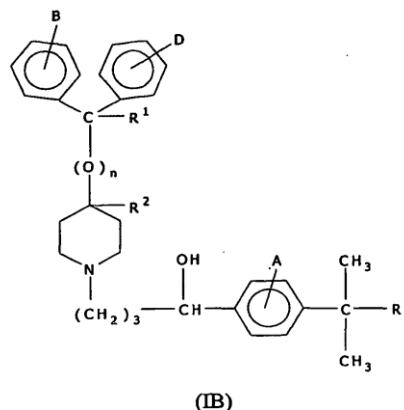
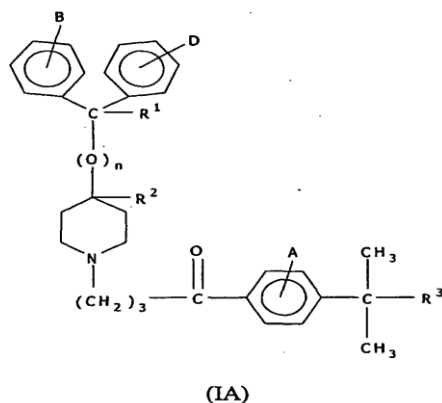




[0040] Opcionalmente, ambos grupos de difenilos del compuesto de piperidina podrían ser alquilo (e.g. metilo) sustituidos en la posición *para* en el metileno, como:



- 15 [0041] Los compuestos preparados por los métodos de la presente invención pueden ser sales farmacéuticamente aceptables en forma de ácido inorgánico o orgánico o sales de adición de base de los compuestos anteriores. Ácidos inorgánicos apropiados son, por ejemplo ácidos hidroclicóricos, hidrobromicos y fosfóricos. Ácidos orgánicos apropiados incluyen ácidos carboxílicos, como acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ciclámico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, dihidroximaleico, benzoico, fenilacético, 4-aminobenzoico, antranílico, salicílico, 4-aminosalicílico, 2-fenoxibenzoico, 2-acetoxibenzoico, y ácido mandélico. Son también ácidos apropiados los ácidos sulfónicos, como metanesulfónico, etanosulfónico, y el ácido β -hidroxi-etanosulfónico. Sales no tóxicas de los compuestos de las Fórmulas arriba identificadas formados con bases inorgánicas y orgánicas incluyen, por ejemplo, los metales alcalinos como sodio, potasio y litio, metales alcalinotérreos, por ejemplo, calcio y magnesio, metales ligeros, por ejemplo aluminio, aminas orgánicas, como aminas primarias, secundarias o terciarias, por ejemplo ciclohexilamina, etilamina, piridina, metilaminoetanol, y piperazina. Estas sales se preparan por medios convencionales, por ejemplo, tratando los compuestos derivados de la piperidina de las Fórmulas IA y/o IB:
- 20
- 25



donde A, B, D, n, R¹, R², y R³ son definidos arriba, con un ácido o base apropiados.

[0042] Los compuestos derivados de piperidina preparados por los métodos de la presente invención pueden ser utilizados como los componentes biológicamente activos en composiciones farmacéuticas. Estos compuestos son útiles como antihistamínicos, agentes antialérgicos, y broncodilatadores. Pueden ser administrados solos o con portadores farmacéuticos apropiados, y pueden estar en forma sólida o líquida, como, pastillas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, o emulsiones.

[0043] Los compuestos preparados por los métodos de esta invención pueden ser administrados de forma oral, parenteralmente, por ejemplo, subcutáneamente, por vía intravenosa, intramuscularmente, intraperitonealmente, por instilación intranasal, o por aplicación a las membranas mucosas, como son las de nariz, garganta, y los tubos bronquiales. Tal aplicación para membranas mucosas puede ser lograda con un atomizador de aerosol que contenga partículas pequeñas de un compuesto de esta invención en forma de rociado o atomización.

[0044] La cantidad de compuesto administrado variará dependiendo del paciente y el modo de administración y podrá ser cualquier cantidad efectiva. La cantidad del compuesto administrado puede variar en un amplio rango para proporcionar una dosis unitaria de una cantidad efectiva de aproximadamente 0,01 a 20 mg/kg del peso corporal del paciente por día para conseguir el efecto deseado. Por ejemplo, los efectos antihistamínicos, antialérgicos y broncodilatadores deseados pueden ser obtenidos por el consumo de una forma de dosis unitaria tal como una pastilla que contenga de 1 a 50 mg del compuesto de la presente invención tomado de 1 a 4 veces diariamente.

[0045] Las formas de dosis unitaria sólida pueden ser del tipo convencional. Esta forma sólida puede ser una cápsula, así como un tipo de gelatina corriente que contiene el compuesto de la presente invención y un portador, por ejemplo, lubricantes y rellenos inertes como, lactosa, sacarosa, o almidón de maíz. En otra realización, estos compuestos son comprimidos con bases de pastillas convencionales tales como lactosa, sacarosa, o almidón de maíz en combinación con aglutinantes como acacias, almidón de maíz, o gelatina, agentes desintegrantes como, almidón de maíz, almidón de patata, o ácido algínico, y un lubricante como ácido esteárico o estearato de magnesio.

[0046] Los compuestos preparados de acuerdo con la presente invención también pueden ser administrados en dosis inyectables mediante la solución o la suspensión de los compuestos de la presente invención en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico. Tales portadores incluyen líquidos estériles como agua y aceites, con o sin la adición de un surfactante y otros adyuvantes aceptables farmacéuticamente. Los aceites ilustrados son los de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, o aceite mineral. En general, agua, suero, dextrosa acuosa y solución de azúcar relacionada, y glicoles como glicol de propileno o glicol de polietileno, son portadores líquidos preferidos, particularmente para las soluciones inyectables.

[0047] Para usar como aerosoles, los compuestos en solución o suspensión pueden ser embalados en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes apropiados, por ejemplo, propelentes de hidrocarburo como propano, butano, o isobutano con adyuvantes convencionales. Estos compuestos pueden ser administrados de forma no presurizada, tal como en un nebulizador o atomizador.

[0048] Los compuestos hechos de acuerdo con la presente invención pueden ser usados para tratar animales de sangre caliente, aves y mamíferos. Ejemplos de tales seres incluyen los seres humanos, gatos, perros, caballos, ovejas, vacas, cerdos, corderos, ratas, ratones, y cobayas.

[0049] Los siguientes ejemplos son ilustraciones de la invención aquí descrita sin ser de naturaleza limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Cribado para Cepas Microbianas Eficientes para la Transformación

5 [0050] Cultivos microbianos para reacciones fueron inoculados usando los procedimientos descritos arriba y especificados en la Tabla 2 inferior. Los inóculos de la reacción fueron preparados para cada microorganismo listado en la Tabla 2 añadiendo 2,5 ml de cada inóculo a 22,5 ml de medio en un matraz de Delong de 125 ml y se incubaron durante 24 horas a 29 °C y a 225 revoluciones por minuto (rpm) en un agitador orbital. Después de este tiempo; el pH de cada cultivo fue registrado y 0,5 ml de los cultivos fueron transferidos a pocillos individuales de una placa de polipropileno de formato estándar de 48 pocillos (volumen nominal 5 ml/pocillo), se cubrieron de lana de vidrio, estopilla, tejido cubierto de teflón, u otra barrera permeable al gas apropiada, y la reacción se inició mediante la adición de 5 µl de una solución stock de DMF de metabolito ácido de terfenadina a 25 g/L (concentración final de reacción de 250 mg/L). Las placas de reacción fueron incubadas a 29 °C y a 225 rpm dentro de cajas de incubación de atmósfera controlada y se les suministró 1 cc/min de gas conteniendo 95% de oxígeno y 5% de gas CO₂ saturado con agua en una cámara rociadora de humidificación.

15 [0051] Muestras de alícuotas fueron recogidas de todos los cultivos a tiempos de reacción entre 2 y 168 horas. A 100 µl de las muestras de reacción transferidas a las fuentes correspondientes de una placa limpia multipocillo, se le añadieron 100 µl de acetonitrilo y la placa fue vortizada durante un minuto. 250 µl de acetato de etilo fue añadido a cada pocillo, y la placa fue vortizada y luego sonicada durante cuatro minutos. La placa fue centrifugada a 3500 rpm durante 5 minutos y 200 µl de la fase orgánica resultante se transfirieron a un pocillo correspondiente de una placa de 96 pocillos. La extracción con acetato de etilo fue repetida una segunda vez sobre la muestra de reacción, y las fases orgánicas fueron combinadas y secadas bajo vacío sin calor. El residuo resultante fue redisoluelto en 150 µl de DMF.

20 [0052] Las muestras fueron analizadas mediante Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) con Espectrometría de Masa de Ionización Química con Presión Atmosférica (ACPI-MS) en una columna de 5 µl Luna C8 (2) (50 mm de largo x 2,0 mm de diámetro) fabricada por Phenomenex.

Tabla 1

Paso	T. Tiempo(min)	Dura.(min)	Flujo (µL/min)	Grad.	Disolvente A	Disolvente B
0	-0,10	0,10	1000	0	90%	10%
1	0,00	0,50	1000	0	90%	10%
2	0,50	2,50	1000	1	40%	60%
3	3,00	2,00	1000	1	0%	100%
4	5,00	1,00	1000	1	0%	100%
5	6,00	0,50	1000	1	90%	10%
6	6,50	0,40	1000	0	90%	10%
7	6,90	0,10	1000	0	90%	10%

Disolvente: A = agua + 0,4% ácido acético,
B = Acetonitrilo + 0,4% ácido acético.
Gradiente: 0 = gradiente de escalón, 1= gradiente lineal.
Detectores: @230nm. en series con ACPI-MS-MS(Espetrómetro de Masa Triple Cuadrupolo), modelo API 2000 por Perkin-Elmer Sciex.

25

[0053] Los rendimientos fueron calculados integrando los valores de área para cada pico cromatográfico correspondiente con un ión molecular definido por ionización positiva ACPI-MS. Los iones moleculares para terfenadina (compuesto 1) y metabolito ácido de terfenadina (compuesto 2) se listan en la Tabla 2. Se asumió que los factores de respuesta para el metabolito ácido de terfenadina son idénticos a los de la terfenadina misma.

30 [0054] La Tabla 2 muestra que las conversiones de hasta el 54% de terfenadina a metabolito ácido de terfenadina podrían ser obtenidas por algunas de las cepas evaluadas.

ES 2 395 243 T3

Tabla 2. Catalizadores para la oxidación de Terfenadina a Metabolito ácido de Terfenadina. (TAM)

Biocatalizador	Colección de Cultivo	Tipo de cepa	de Preparación del Biocatalizador	pH del Cultivo	Producción de TAM después de 6 días
<i>Streptomyces rimosus</i>	NRRL-2234	gram +	multi-etapa	5	54%
<i>Stemphylium consortiale</i>	UI-4136	hongos	multi-etapa	7	50%
<i>Gliocladium deliquescens</i>	NRRL-1086	hongos	cryoready	7	39%
<i>Cunninghamella bainieri</i>	SC-3065	hongos	cryoready	7	27%
<i>Bacillus cereus</i>	UI-1477	gram +	cryoready	7	25%
<i>Cunninghamella banieri</i>	SC-3065	hongos	multi-etapa	7	18%
<i>Botrytis allii</i>	NRRL-2502	hongos	multi-etapa	5	18%
<i>Cyalinus striatus</i>	MR-356	hongos	multi-etapa	5	11%
<i>Streptomyces rimosus</i>	NRRL-2234	gram +	cryoready	7	11%
<i>Rhizopus sp.</i>	MR-224	hongos	multi-etapa	5	10%
<i>Pycnidiosphora dispersa</i>	MR-346	hongos	multi-etapa	7	10%
<i>Absidia spinosa var. biappendiculata</i>	MR-7600	hongos	multi-etapa	7	9%
<i>Rhizopus oryzae</i>	MR-RO	hongos	cryoready	6	8%
<i>Cunninghamella echinulata</i>	NRRL-1386	hongos	multi-etapa	7	8%
<i>Cunninghamella echinulata</i>	NRRL-3655	hongos	multi-etapa	5	8%
<i>Gliocladium deliquescens</i>	NRRL-1086	hongos	multi-etapa	7	7%
<i>Pseudomonas sp.</i>	DG-9816	gram-	multi-etapa	7	6%
<i>Helicostylum piriforme</i>	QM-6945	hongos	cryoready	7	5%
<i>Aspergillus flavipes</i>	ATCC-1030	hongos	multi-etapa	7	4%
<i>Mucor circinelloides f. griseo-cyanus.</i>	IFO-4563	hongos	multi-etapa	7	4%
<i>Gelasinospora autosteria</i>	MR-GA	hongos	multi-etapa	6	3%
<i>Bacillus fusiformis</i>	ATCC-7055	gram +	-	8	3%
<i>Streptomyces griseus</i>	mutante de	gram +	multi-etapa	5	3%

ES 2 395 243 T3

Biocatalizador	Colección de Cultivo	Tipo de cepa	de Preparación del Biocatalizador	pH del Cultivo	Producción de TAM después de 6 días
	ATCC-13273				
<i>Rhodotorula rubra</i>	ATCC-36994	levadura	cryoready	7	3%
<i>Cunninghamella echinulata</i>	(+)	hongos	cryoready	6	3%
<i>Cunninghamella echinulata</i>		hongos	cryoready	6	3%
<i>Mucor mucedo</i>	ATCC-7941	hongos	multi-etapa	7	3%
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UI-251	hongos	cryoready	7	3%
<i>Candida parasitosis var. quercus</i>	ATCC-56466	levadura	multi-etapa	7	3%
<i>Streptomyces griseus</i>	10137-ATCC	gram +	cryoready	7	2%
<i>Bacillus cereus</i>	14591-NRRL-B	gram +	cryoready	7	2%
<i>Streptomyces cavourensis</i>	27732-ATCC	gram +	cryoready	7	2%
<i>Mucor recurvatus</i>	36-MR	hongos	cryoready	7	2%
<i>Penicillium notatum</i>	36740-ATCC	hongos	cryoready	7	2%
<i>Aspergillus carbonarium (Bainier) Thom</i>	6277-ATCC	hongos	cryoready	5	2%
<i>Candida lipolytica</i>	8661-UI	levadura	cryoready	4	2%
<i>Ascoidia</i>	MR-Asc	hongos	multi-etapa	7	2%
<i>Lentinus lepidius</i>	MR-LL	hongos	multi-etapa	7	2%
<i>Pseudomonas putida (Banqueda)</i>	9866-NCIMB	bacteria	cryoready	6	2%
<i>Trichophylon gallinae</i>	1210-MR	hongos	cryoready	7	1%
<i>Streptomyces griseus</i>	13968-ATCC	gram +	cryoready	7	1%
<i>Lophotrichus martinii</i>	177-MR	hongos	cryoready	7	1%
<i>Penicillium notatum</i>	18233-ATCC	hongos	cryoready	7	1%

ES 2 395 243 T3

Biocatalizador	Colección de Cultivo	Tipo de cepa	Preparación del Biocatalizador	pH del Cultivo	Producción de TAM después de 6 días
<i>Aspergillus carbonarium</i> (Bainier) Thom	6277-ATCC	hongos	cryoready	5	2%
<i>Candida lipolytica</i>	8661-UI	levadura	cryoready	4	2%
<i>Ascoidia</i>	MR-Asc	hongos	multi-etapa	7	2%
<i>Lentinus lepidius</i>	MR-LL	hongos	multi-etapa	7	2%
<i>Pseudomonas putida</i> (Banqueda)	9866-NCIMB	bacteria	cryoready	6	2%
<i>Trichophyton gallinae</i>	1210-MR	hongos	cryoready	7	1%
<i>Streptomyces griseus</i>	13968-ATCC	gram +	cryoready	7	1%
<i>Lophotrichus martinii</i>	177-MR	hongos	cryoready	7	1%
<i>Penicillium notatum</i>	18233-ATCC	hongos	cryoready	7	1%
<i>Aspergillus ochraceous</i>	18500-ATCC	hongos	cryoready	6	1%
<i>Streptomyces catenulae</i>	23893-ATCC	gram +	cryoready	7	1%
<i>Bacillus subtilis</i>	2485-UI	gram +	cryoready	7	1%
<i>Aspergillus alliaceus</i>	315-UI	hongos	cryoready	7	1%
<i>Mycobacteria sp</i>	3683-NRRL	hongos	cryoready	7	1%
<i>Spicaria violacea</i>	3702-MR	hongos	cryoready	7	1%
<i>Mycobacteria bisrymcum</i>	463-AM	hongos	cryoready	7	1%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	51-MR	hongos	cryoready	7	1%
<i>Candida lipolytica</i>	746-IFO	levadura	cryoready	4	1%
<i>Polyporus anceps</i>	784-F-S	hongos	cryoready	7	1%
<i>Candida guilliermondii</i>	9058-UI	levadura	cryoready	6	1%
<i>Cunninghamella elegans</i>	9245-ATCC	hongos	cryoready	7	1%
<i>Pseudomonas sp (tipo nafalena salvaje)</i>	9816-DG	gram-	cryoready	7	1%
<i>Aspergillus terricola</i>	MR-At	hongos	cryoready	7	1%
<i>Hansends cadaver levadura</i>	MR-Hans	levadura	cryoready	7	1%
<i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan), <i>toluene gene</i>	33015-ATCC	bacteria	cryoready	5	1%
<i>Fusidium coccineum</i>	14700-ATCC	hongos	cryoready	7	1%

Biocatalizador	Colección de Cultivo	Tipo de cepa	Preparación del Biocatalizador	pH del Cultivo	Producción de TAM después de 6 días
<i>Enterococcus faecium</i>	51558-ATCC	bacteria	cryoready	4	1%
<i>Streptomyces griseus mutant</i>	13273-ASF2	bacteria	cryoready	7	1%
<i>Streptomyces griseus mutant</i>	13273#11	bacteria	cryoready	6	1%

^AATOC=America Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209

^BDSM=Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), Grisebachstrasse 8, D-34 Goettingen, Braunschweig, Germany.

^CUI, SC, MR, DG, and QM=University of Iowa Culture Collection Iowa City IA, 52240

^DNRRL=USDA Agricultural Research Service, 1815N. University Ave. Peoria IL, 60604

^ELas designaciones "multi-etapa" y "cryoready" refieren un método específico usado en cada ejemplo para preparar el inóculo microbiano para la reacción. Detalles completos para cada método son descritos en la sección Descripción Detallada de la Invención.

Ejemplo 2.

5 [0055] 25 ml de medio líquido de harina de soja en un matraz Delong de 125 ml es inoculado con *Streptomyces rimosus* (NRRL-2234) obtenido de un cultivo sólido inclinado, como se describe en el Ejemplo 1. Después de incubar a 29 °C y 225 rpm durante 24 horas, 500 µl de solución de cultivo (pH 5.0) fueron transferidos a un pocillo de una placa de 48 pocillos profundos y 125 µg de terfenadina disuelta en 5 µl de DMF se añadieron al cultivo. Después del cultivo adicional en una cámara de incubación a 29 °C durante 7 días, el caldo microbiano resultante fue extraído con acetonitrilo y acetato de etilo. La fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, y, luego, fue retirado el disolvente. El residuo fue redisoluelto en DMF y analizado mediante HPLC-MS. La integración indicó que el 76% del material recuperado era TAM.

10 **Ejemplo 3 .**

15 [0056] Como se describe arriba, 2,5 ml de un cultivo congelado de *Gliocladium deliquescens* se cultivaron en 25 ml de medio de cultivo a pH 7 durante 24 horas. 500 µl del cultivo líquido fueron transferidos a un pocillo de una placa de 48 pocillos profundos y 125 µg de terfenadina disuelta en 5 µl de DMF se añadieron al cultivo y se incubó a 29 °C durante 1 semana en una cámara de incubación. La recuperación de producto y el análisis demostraron que este procedimiento produjo un rendimiento del 39% TAM.

Ejemplo 4

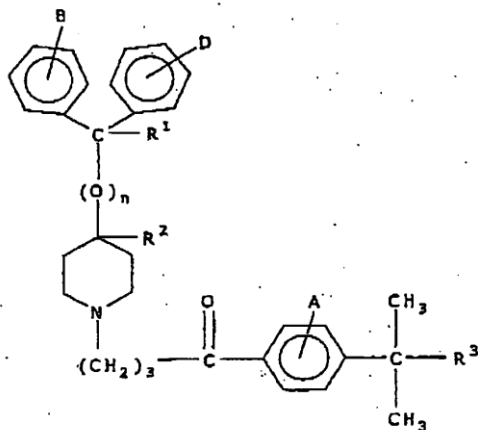
[0057] Como se describe en el Ejemplo 2, 125 µg de terfenadina disueltos en 50 ml de DMF se añadieron a 500 µl de la solución del cultivo de *Stemphylium consortiale* (4136-UI) en un reactor de placa multipocillo. La recuperación de producto y el análisis demostraron que este procedimiento produce un rendimiento del 50% TAM.

20 **Ejemplo 5**

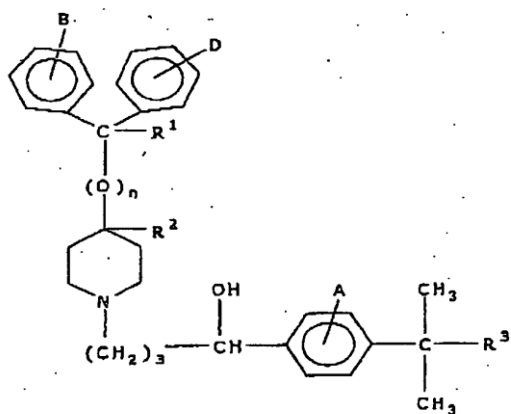
25 [0058] Un cultivo de dos semanas de edad sólido de agar de *Streptomyces rimosus* (ATCC 14673) fue inoculado en 25 ml de medio de haba de soja en un matraz Delong de 125 ml durante 72 horas a 29 °C y 225 rpm. 2,5 ml de este cultivo líquido fue transferido a 22,5 ml de medio de harina de haba de soja a pH 5 y cultivado a 29 °C, 225 rpm durante 24 horas. 12,5 mg de terfenadina se disolvió en 250 µg de DMF y se añadió al cultivo y se incubó por 1 semana. La recuperación de producto y el análisis demostraron que este procedimiento, realizado de acuerdo con el Ejemplo 2, produce un rendimiento de 27% TAM.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un compuesto de producto teniendo una estructura de acuerdo con las Fórmulas IA y/o IB:



(IA)



(IB)

5

en donde:

N es 0 o 1;

R¹ es hidrógeno o hidroxilo;

R² es hidrógeno;

10

o, cuando n es 0, R¹ y R² tomados juntos forman un segundo enlace entre los átomos de carbono que llevan R¹ y R², siempre que cuando n es 1, R¹ y R² son cada uno hidrógeno;

R³ es -COOH o COOR⁴;

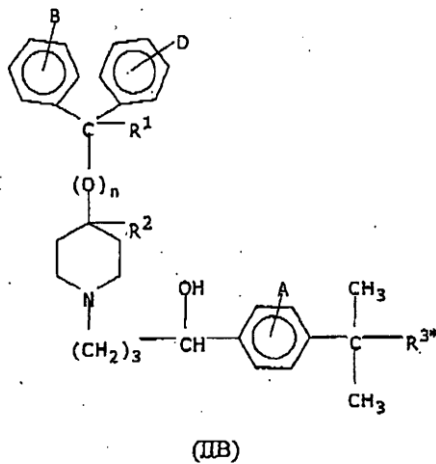
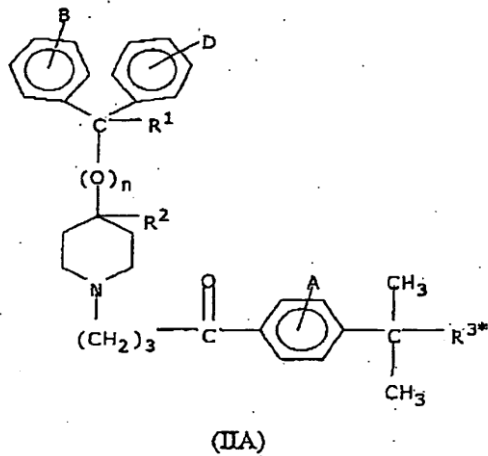
R⁴ es una fracción alquilo o arilo;

15

A, B, y D son los sustituyentes de sus anillos, cada uno de los cuales puede ser diferente o el mismo, y se seleccionan entre el grupo que consta de hidrógeno, halógenos, alquilos, hidroxilo, y alcoxi,

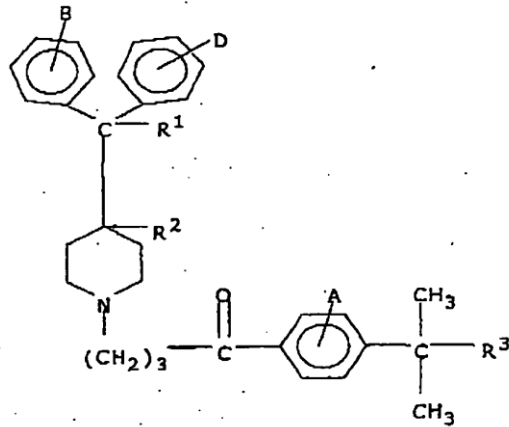
dicho procedimiento comprendiendo:

incubar un compuesto inicial que tiene una estructura de acuerdo con las Fórmulas IIA y/o IIB:

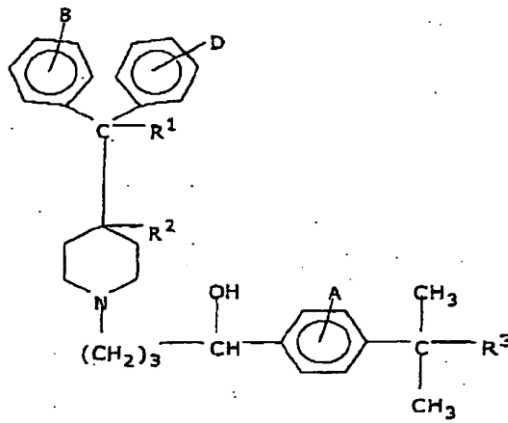


donde R^3 es $-CH_3$ y R^1 , R^2 , A, B, y D han sido definidos arriba, en la presencia de un microorganismo bajo condiciones efectivas para producir el compuesto de producto,

- 5 donde el microorganismo es del género *Bacillus* o *Pseudomonas*.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el microorganismo es del género *Bacillus*.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde el microorganismo es *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus fusiformis*.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el microorganismo es *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp (naphthalene wild type)* o *Pseudomonas sp*.
- 10 5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto de producto tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula IIIA y/o IIIB:



(IIIA)

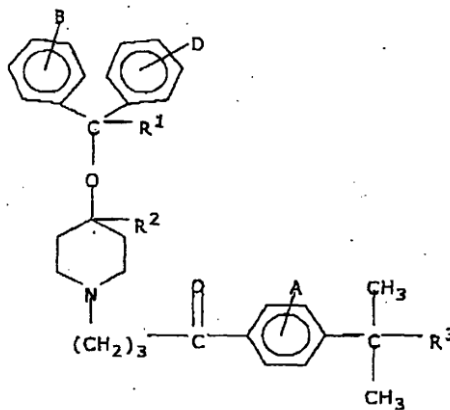


(IIIB)

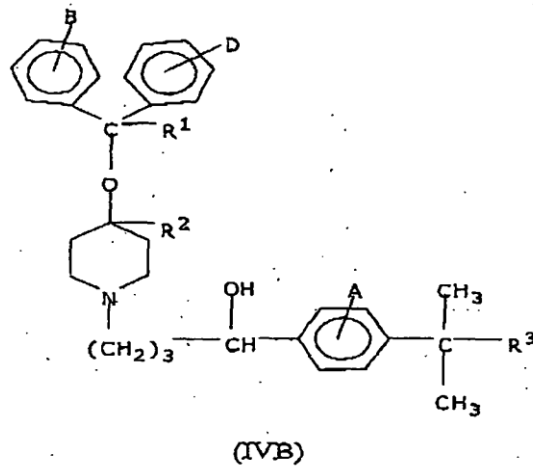
donde R¹, R², R³, A, B, y D son definidos arriba.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde el compuesto del producto es ácido α,α-4-(4-(4-hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil)-1-hidroxitil)-dimetilfenil acético.

7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto de producto tiene una estructura de acuerdo con las Fórmulas IVA y/o IVB:



(IVA)



donde R^1 , R^2 , R^3 , A, B, y D son definidos arriba.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, donde el compuesto de producto es el ácido α , α -4-[4-(4-difenilmetoxi)-1-piperidinil]-oxobutil]-dimetilfenil acético.
- 5 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha incubación es llevada a cabo a una temperatura de 20 °C a 80 °C.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha incubación es llevada a cabo a un pH de 4 a 9.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha incubación es llevada a cabo durante un período de 2 a 240 horas.
- 10 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde antes de dicha incubación, el microorganismo es sometido a crioconservación o inducción en cultivo líquido multietapa.