(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 474 691**

(51) Int. Cl.:

C12P 17/10 (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)
C12P 35/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2007** **E 07802173 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2064331**

(54) Título: **Proceso para la preparación de 3-aminopiperidina N-protegida o 3-aminopirrolidina N-protegida ópticamente activa por medio de resolución óptica de mezclas racémicas de aminas empleando una omega-transaminasa**

(30) Prioridad:

06.09.2006 EP 06018637

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2014

(73) Titular/es:

LONZA AG (100.0%)
LONZASTRASSE
3930 VISP, CH

(72) Inventor/es:

ROBINS, KAREN;
BORNSCHEUER, UWE y
HÖHNE, MATTHIAS

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 474 691 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

Proceso para la preparación de 3-aminopiperidina N-protegida o 3-aminopirrolidina N-protegida ópticamente activa por medio de resolución óptica de mezclas racémicas de aminas empleando una omega-transaminasa

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de aminas quirales ópticamente activas.

Las aminas quirales desempeñan un importante papel en las industrias farmacéutica, agroquímica y química. Se usan frecuentemente como intermedios o sintonas para la preparación de varias sustancias fisiológicamente, por ejemplo farmacéuticamente activas, tales como cefalosporina o derivados de pirrolidina. En un gran número de diferentes aplicaciones de aminas quirales, únicamente una forma particular ópticamente activa, ya sea el enantiomero (R) o el (S), es fisiológicamente activa. De este modo, existe una clara necesidad de proporcionar procesos para la preparación de aminas quirales en una forma ópticamente activa.

Estas necesidades se satisfacen parcialmente por medio de la preparación de aminas quirales por medio de cristalización de sales diastereoméricas a través de la adición de ácidos carboxílicos quirales (Breuer y col., Angewandte Chemie (2004) 116, 806-843). Otros métodos químicos usan síntesis enantioselectiva por medio de la reducción de precursores proquirales con dobles enlaces C=N.

Además, se conoce la escisión estereoselectiva de racematos usando varias enzimas, tales como proteasas, amidasas o lipasas (Born-scheuer and Kazlauskas, Hidrolasas en Organic Synthesis (2005), Wiley-VCH Weinheim). También se conoce que las transaminasas específicas, concretamente las α-transaminasas, son apropiadas para la preparación de amino ácidos ópitcamente activos (Bartsch y col., Appl. Environm. Microbiol. (1996) 62, 3794-3799, Cho y col., Biotechnol. Bioeng. (2003) 83, 226-234, el documento JP 011 53084 A2 (1998), el documento JP 633 04986 A2 (1998), el documento EP 0 248 357 A2 y Ziehr y col., Biotechnol, Bioeng. (1987) 29, 482-487).

El documento SHIN, J. S. & KIM, B.G.: "Exploring the Active Site of Amine: Pyruvate Aminotransferase on the Basis of the Substrate Structure-Reactivity Relationship: How the Enzyme Controls Substrate Specificity and Stereoselectivity" (JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 67, nº. 9, mayo 2002, páginas 2848-2853) divulga un proceso para la preparación de una amina quiral que comprende:

a) proporcionar piruvato como una molécula que contiene un grupo ceto y una mezcla racémica de 3-aminopirrolidina,
b) hacer reaccionar el piruvato y la mezcla racémica de la amina con la omega-transaminasa (S)-selectiva *Vibrio fluvialis*
c) obtener una amina quiral, un producto de amina y un producto de cetona.

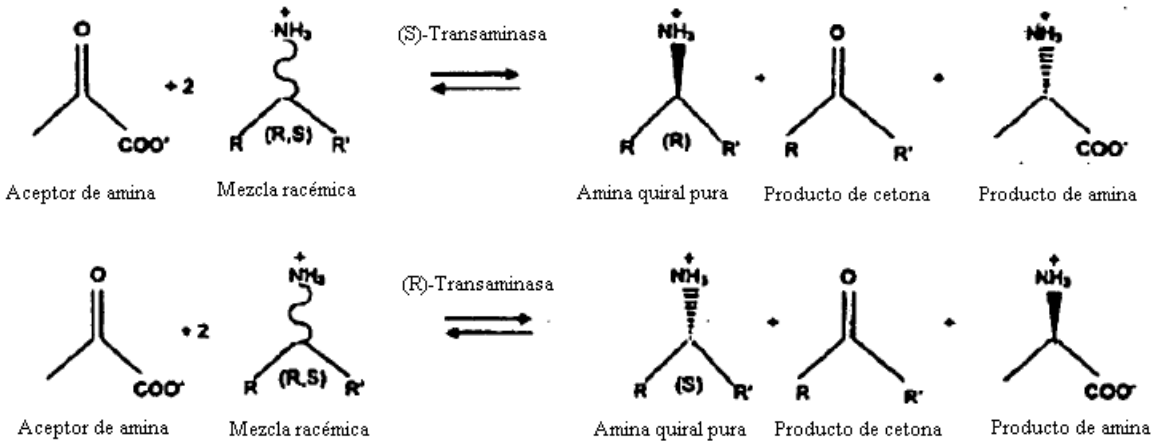
No obstante, estos procesos de la técnica anterior experimentan varias desventajas. Aunque los procesos enzimáticos normalmente emplean, en contraste con los métodos clásicos, condiciones suaves favorables y logran una estereoselectividad apropiada, usan enzimas de forma regular, cuya especificidad por el sustrato, enantioselectividad y/o conversión no son suficientemente elevadas para los procesos aplicables desde el punto de vista industrial. Además, uno de los inconvenientes más prominentes del uso de transaminasas para la preparación de aminas ópticamente activas viene representado por el sustrato frecuentemente observado y el fenómeno de la inhibición de producto. Por tanto, es uno de los objetivos de la presente invención proporcionar un proceso mejorado para la preparación de aminas quirales ópticamente activas, en particular un proceso con una conversión mejorada y/o una enantioselectividad mejorada.

La presente invención soluciona el problema técnico subyacente proporcionando un proceso para la preparación de una amina quiral ópticamente activa, comprendiendo dicho proceso hacer reaccionar un compuesto aceptor de amina que comprende un grupo ceto y una mezcla racémica de 3-aminopirrolidina (3AP) o 3-aminopiperidina (3APi), que porta cada uno un grupo protector en el átomo de nitrógeno del anillo en presencia de una transaminasa (R)- o (S)-selectiva con un código de clasificación EC 2.6.1.18, para obtener un enantiomero de 3AP o 2APi, correspondiendo el compuesto amino a dicho compuesto receptor de aminas, y pirrolidin-3-ona N-protegina o piperidi-3-ona N-protegida como producto de cetona.

El proceso de la presente invención comprende (a) proporcionar una molécula que contiene un grupo cetona y una mezcla racémica de 3AP 1-N-protegida o 3APi 1-N-protegida, es decir, una mezcla de dos enantiomeros de la amina respectiva, (b) hacer reaccionar la molécula que contiene un grupo ceto y la mezcla racémica de la amina respectiva con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva con el código de clasificación EC 2.6.1.18 y (c) obtener una amina quiral ópticamente activa, un producto de amina y un producto de cetona.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, en una etapa de proceso opcional adicional posterior, la amina quiral ópticamente activa obtenida en la etapa c) se aísla y purifica a partir de la mezcla de reacción obtenida en la etapa c).

La reacción de la presente invención sigue en principio el siguiente esquema:



De acuerdo con la presente invención, la mezcla racémica de 3-aminopirrolidina (3AP) o la mezcla racémica de 3-aminopiperidina (3APi) porta un grupo protector en el átomo de nitrógeno secundario del anillo, es decir, en la posición 1 mientras que el grupo amino en el centro quiral de la amina, es decir la posición 3, que participa en la transaminación, no está protegido.

La presencia del grupo protector provoca que la amina protegida, es decir la 3AP 1-N-protegida o 3APi 1-N-protegida, se convierta más eficazmente en la amina quiral ópticamente activa deseada. De este modo, la presencia del grupo protector provoca que se obtengan rendimientos más elevados de la amina quiral ópticamente activa deseada. En comparación con la conversión de la amina de partida sin un grupo protector en el átomo de nitrógeno de anillo, es menos eficaz.

De este modo, la presente invención proporciona un proceso para la escisión enzimática de aminas 1-N-protegidas por medio del uso de al menos una transaminasa (R)- o (S)-selectiva para la transaminación de un grupo amino a partir de un enantiomero específico de la mezcla de enantiomeros de amina quiral 1-N-protegida hasta un aceptor de amina, formándose de este modo el producto ópticamente activo deseado. En el contexto de la presente invención, las expresiones "escisión enzimática de aminas" o "escisión enzimática de una mezcla racémica" significan la resolución óptica de una mezcla racémica por medio de transformación enzimática estereoselectiva de un enantiomero. Dependiendo de la enantiopreferencia de la transaminasa (R)- o (S)-selectiva usada, se obtiene una amina quiral ópticamente activa de la configuración óptica deseada, es decir un enantiomero bien (R) o bien (S). De este modo, por medio del uso de una transaminasa (S)-selectiva en una realización de la presente invención para la síntesis de escisión enzimática, se elimina el enantiomero (S) de la mezcla racémica y se genera el enantiomero (R) ópticamente activo deseado de la amina quiral, al tiempo que por medio del uso en otra realización de la presente invención, una transaminasa (R)-selectiva elimina el enantiomero (R) de la mezcla racémica y genera el enantiomero (S) ópticamente activo deseado. Además de la amina quiral ópticamente activa deseada, la reacción genera un producto de cetona a partir de la transaminación de la mezcla racémica, un producto de amina a partir del aceptor de amina y un enantiomero no deseado parcialmente no escindido así como también un aceptor de amina no convertido.

En una realización preferida de la presente invención el grupo protector es un grupo terc-butoxicarbonilo (Boc). En otra realización preferida el grupo protector es un grupo bencilo. En otra realización preferida, el grupo protector es un grupo carbobenzoxi - también denominado benciloxicarbonilo - (Cbz).

Una transaminasa es una enzima que depende de piridoxalfosfato que cataliza la transferencia de grupos amino. Las transaminasas se clasifican en E.C. 6.1.X. La transaminasa es una transaminasa (R)- o (S)-selectiva, en particular una ω-transaminasa.

En el contexto de la presente invención, una transaminasa (R)- o (S)-selectiva es una enzima con el código de clasificación E.C. 2.6.1.18. Estas amino transaminasas se caracterizan por que usan principalmente aminas primarias como sustratos. Estas enzimas se caracterizan además por exhibir una constante de equilibrio de reacción catalizada por transaminasa (R)- o (S)-selectiva que es mayor que 1. Las transaminasas (R)- o (S)-selectivas que se pueden usar de acuerdo con la presente invención se describen por ejemplo en Iwasaki y col., Biotechnol. Lett. (2003), 1843-1846, Shin y col., Biotechnol. Bioeng. (1997) 55, 348-358, Shin y Kim, Book of Abstracts, 217th ACS National Meeting, Anaheim, Calif, 21-25 de marzo, (1999) 180, Shin y Kim, Biosc. Biotechnol. Biochem. (2001) 65, 1782-1788 y Shin y Kim, Biotechnol. Bioeng. (1998) 60, 534-540.

De este modo, en una realización preferida de la presente invención, la transaminasa (R)- o (S)-selectiva usada en el presente proceso es una transaminasa (R)- o (S)-selectiva obtenida a partir de Vibrio fluvialis, en particular a partir de la cepa JS17, Alcaligenes denitrificans, en particular a partir de la cepa Y2k-2, Klebsiella pneumoniae, en particular a partir de la cepa JS2F o Bacillus thuringiensis, en particular de la cepa JS64 (para las designaciones de cepa véase Shin y Kim, 1998, anterior). Por supuesto, la presente divulgación también comprende, bajo el término transaminasa (R)- o (S)-selectiva, un extracto de un organismo, tal como un microorganismo o célula, que contiene una transaminasa (R)- (S)-selectiva o una célula viva o muerta o microorganismo que comprende una transaminasa (R)- o (S)-selectiva. Dicho microorganismo o célula o extracto o enzima de transaminasa se puede usar en forma inmovilizada o no inmovilizada. La transaminasa (R)- o (S)-selectiva también puede ser una transaminasa (R)- o (S)-selectiva modificada genéticamente o de origen natural, producida de manera recombinante, que está codificada de forma parcial o completa por una secuencia de ácido nucleico o su derivado presente en uno de los organismos anteriormente identificados o equivalente a ella.

En el contexto de la presente invención, la expresión amina quiral ópticamente activa se refiere a la misma cuestión que la expresión amina quiral enantioméricamente activa. Estos términos, en particular, se refieren a una preparación que está esencialmente libre, en una realización más preferida, libre del enantiomero no deseado. Por consiguiente, una amina quiral ópticamente activa comprende esencialmente un exceso de un enantiomero o incluso consiste únicamente en un enantiomero.

En particular, una amina quiral opticamente activa tiene una pureza óptica de al menos el 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,7, 99,8 y en particular del 99,99 %.

En la presente divulgación, la pureza óptica viene dada por el % en exceso de un enantiomero con respecto al otro. De este modo, la pureza óptica en % es el cociente de la diferencia entre las concentraciones de enantiomero (R) y (S) y la suma de las concentraciones de ambos enantiomeros (pureza óptica de A en % = ([A]-[B]: ([A]+[B]) x 100, en la que A y B representan las concentraciones de los enantiomeros (R) y (S) o vice versa).

En la presente invención, es preferible que la mezcla racémica de la amina quiral se convierta en la amina quiral ópticamente activa con un grado de conversión de al menos el 30, 40, 45, 46, 47, 48, 49, en particular del 50 %. Las concentraciones para analizar la pureza óptica y la conversión se pueden determinar por ejemplo usando HPLC, cromatografía de gases (GC) o métodos foto- o fluorimétricos.

De acuerdo con la presente invención, se podría mostrar que el grupo protector tiene un efecto positivo sobre la velocidad de conversión y, de este modo, conduce a un rendimiento elevado de (R)-3-aminopirrolidina usando una transaminasa (S)-específica. Además, el grupo protector mostró también un efecto menos pronunciado sobre la velocidad de conversión de 3-aminopiperidina.

En el contexto de la presente invención, un aceptor de amina es una molécula que contiene un grupo ceto y que es capaz de aceptar un grupo de amina transferido desde un donante de amina, es decir, en el caso presente a partir de una amina o mezcla racémica de aminas, por medio de una transaminasa (R)- o (S)-selectiva. En una realización particularmente preferida de la presente invención, el aceptor de amina es un α-ceto ácido. En una realización incluso más preferida de la presente invención, se selecciona el aceptor de amina entre el grupo que consiste en ácido fenilpirúvico, una de sus sales, ácido pirúvico, una de sus sales, ácido glioxílico, una de sus sales, acetofenona, ácido 2-cetoglutárico, una de sus sales, acetona, ácido 3-oxobutírico, una de sus sales y 2-butanona. Además, también se pueden usar 3-oxopirrolidina (3-OP), (3-piridil)metilcetona (3-PMK), éster etílico de ácido 3-oxobutírico (3-OBEE) o éster metílico de ácido oxopentanoico (3-OPME), en otra realización de la presente invención, como aceptores de amina.

De acuerdo con la invención, el producto de amina obtenido por medio de la conversión del ácido fenilpirúvico de aceptor de amina es fenilalanina. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de ácido pirúvico de aceptor de amina es alanina. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de ácido glioxílico de aceptor de amina es glicina. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de acetofenona de aceptor de amina es 1-feniletilamina. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de ácido 2-cetoglutárico de aceptor de amina es ácido glutámico. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de acetona de aceptor de amina es isopropilamina. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de ácido 3-oxobutírico de aceptor de amina es ácido 3-aminobutírico. El producto de amina obtenido por medio de la conversión de 2-butanona de aceptor de amina es sec-butilamina. El producto de amina obtenido por medio de la conversión del éster etílico de ácido 3-oxobutírico de aceptor de amina (3-OBEE) es ácido 3-aminobutírico. El producto de amina obtenido por medio de la conversión del éster metílico de ácido 3-oxopentanoico de aceptor de amina (3-OPME) es éster metílico de ácido 3-aminopentanoico.

Por tanto, la amina quiral ópticamente activa deseada y obtenida, en una realización preferida, depende de la transaminasa (R)- o (S)-selectiva usada, ya sea del enantiomero (S) o (R) de dicha amina quiral.

De acuerdo con la invención, el producto de cetona obtenido por medio del presente proceso es una pirrolidin-3-ona 1-N-protegida o una piperidin-3-ona 1-N-protegida.

El proceso de la presente invención comprende la reacción de una mezcla racémica de 3-aminopirrolidina 1-N-protegida (3AP) con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva y un aceptor de amina para obtener 3AP 1-N-protegida (R) o (S). El proceso de la invención también comprende la reacción de una mezcla racémica de 3-aminopiperidina 1-N-protegida (3APi) con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva y un aceptor de amina para obtener 3APi 1-N-protegida (R) o (S).

De acuerdo con el proceso de la presente invención, el grupo protector de 3AP 1-N-protegida obtenido o 3APi 1-N-protegida se puede retirar por medio de cualquier método de desprotección conocido en la técnica de la retirada. Un método para la retirada del grupo de terc-butoxicarbonilo (Boc) que usa HCl concentrado y acetona, por ejemplo, se describe por parte de Coffey y col., Org. Proc. Res. Dev., 8 (6) (2004), páginas 945-947.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el aceptor de amina y la mezcla racémica de aminas se hacen reaccionar con la transaminasa en un medio acuoso, por ejemplo, un tampón fisiológico. En una realización particularmente preferida, la reacción de transaminación se lleva a cabo a un pH dentro del intervalo de 5 a 9, en particular de 7 a 8,5. En una realización particular preferida, la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de 10 a 65 ºC, preferentemente de 20 a 50 ºC, en particular de 18 a 25 ºC, preferentemente a temperatura ambiente o de 34 a 39 ºC, en particular a 37 ºC. En otra realización preferida de la presente invención, el aceptor de amina y la mezcla racémica de aminas se proporcionan en una proporción molar de 1:1 a 1:10, en particular de 1:1 a 1:4. En una realización preferida de la presente invención, la actividad enzimática puede ser de 1 a 20.000 μmol/min.

En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de una amina quiral ópticamente activa de acuerdo con lo anterior, por medio del cual en una primera etapa de proceso a) se proporcionan un aceptor de amina y una mezcla racémica de 3-aminopirrolidina (3AP) o 3-aminopiperidina (3APi), que porta cada uno un grupo protector en el nitrógeno de anillo, en una segunda etapa de proceso b) se hace reaccionar la mezcla racémica de la amina quiral y el aceptor de amina con al menos una ω-transaminasa, en una tercera etapa de proceso c) se obtienen una amina quiral ópticamente activa, un producto de amina y un producto de cetona, y en el que en otra etapa de proceso d) se retira el producto de cetona y/o el producto de amina obtenido en la etapa c) de la mezcla de reacción obtenida, en particular retirado por medio de reacción con una enzima, que significa una escisión enzimática, en particular que usa una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en una descarboxilasa, una sintasa o una deshidrogenasa.

En otra realización preferida se pueden retirar una cetona y/o un producto de amina por medio de evaporación o extracción. En otra realización preferida, se puede retirar el producto de cetona obtenido por medio de descarboxilación espontánea.

En otra realización preferida, se retira el producto de cetona obtenido en la etapa c) por medio de reacción con una alcohol deshidrogenasa (ADH), por ejemplo un Lactobacillus kefir ADH, que preferentemente reduce acetofenona a 1-feniletanol.

En una realización preferida de la presente invención, la cetona y/o el producto de amina obtenidos en la etapa c) se retiran de forma continua a partir de la mezcla de reacción, preferentemente por medio de una extracción continua.

En una realización particularmente preferida el producto de cetona se puede retirar por medio del uso de un sistema de dos fases o un reactor de enzima-membrana por medio de extracción continua.

Estas realizaciones particularmente preferidas proporcionan la ventaja de obtener la conversión deseada, ya que se retira el producto de cetona en forma de subproducto del presente proceso a partir de la reacción de equilibrio. Se fuerza la reacción en la dirección de los productos, proporcionando de este modo una elevada estereoselectividad a la conversión en los productos deseados. La retirada del producto de cetona es en particular útil ya que minimiza la inhibición de producto.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención son la materia objeto de las sub reivindicaciones.

La presente invención se ilustra con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Escisión enzimática de (R,S)-B3AP

Para el presente ejemplo, se usaron una ω-transaminasa (S) de Vibrio fluvialis (Julich Chemical Solutions, Alemania), en lo sucesivo denominada TA7, y una ω-transaminasa (S) de Alcaligenes denitrificans (Julics Chemical Solutions, Alemania), en lo sucesivo denominada TAB, en la mezcla de reacción en una concentración final de 4 u/ml en Tris-HCl 50 mM. Se usó una disolución de una mezcla racémica de (R,S)-B3AP 10 mM (concentración final) (N-1-boc-aminopiridina) (20 μmol) como educto y se hizo reaccionar en la mezcla de reacción a 37 ºC durante 15 horas con TA7 o TA8 usando piruvato en una concentración final de 10 mM como aceptor de amina.

Tras 15 horas de tiempo de reacción, ω-transaminasa (S) TA7 condujo a una pureza óptica de la amina ópticamente activa obtenida (R)-B3AP de 62,5 +/- 0,5 % con una conversión de 39,0 +/- 5 %.

La ω-transaminasa (S) TA8 condujo tras 15 horas de tiempo de reacción a una pureza óptica de (R)-BAP ópticamente activa obtenida de 97,5 +/- 0,5 % con una conversión de 47,6 +/- 5 %.

Es evidente que las purezas ópticas obtenidas son elevadas o incluso muy elevadas y están próximas a los valores que cabe esperar para una enzima estereoselectiva ideal. Debe apreciarse que para TA7 la pureza óptica es comparativamente menor, de la manera más probable, debido a una conversión más baja.

Ejemplo 2: Escisión enzimática de (R,S)-1-N-Boc-3-amino-piperidina

Para la escisión enzimática de una mezcla racémica de (R, S)-1-N-Boc-3-aminopiperidina (concentración final: 10 mM) con piruvato como aceptor de amina (concentración final: 10 mM); se usó ω-transaminasa (S) TA8 en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5. A una concentración de enzima de 2 U/ml de TA8, se alcanzó una pureza óptica de (R)-1-N-Boc-3-aminopiperidina ópticamente activa obtenida de 70 +/- 0,5 % tras 72 horas de tiempo de reacción a 37 ºC con una conversión de 54 +/- 5 %. Usando 20 U/ml de TA8 en las mismas condiciones de reacción, el resultado fue una pureza óptica del (R)-1-N-Boc-3-aminopiperidina obtenida de 98,5 +/- 0,5 % con una conversión de 72 +/- 5 %.

Ejemplo 3: Preparación de (R)-B3AP ópticamente activa por medio de escisión racémica

Se usaron 230 mg (0,85 mmol) de (R,S)-B3AP racémica en una concentración final de 10 mM con 0,8 U/ml de ω-transaminasa (S) TA8. Se usó piruvato con una concentración final de 10 mM como aceptor de amina. Se llevó a cabo la reacción a pH 8 con tampón de fosfato de potasio 50 mM a una temperatura de 37 ºC. Se determinó el exceso de enantiomeros por medio de cromatografía de gases. Tras 7 horas de tiempo de reacción la pureza óptica de los 89,4 mg obtenidos de (R)-B3AP fue de 98,7 +/- 0,5 % con un rendimiento de 39 +/- 5 % (0,33 mmol).

Tras completar la reacción, se ajustó el valor de pH con HCl 5 N a pH 5. Se extrajo B3OP formado cuatro veces, cada una de ellas con 75 ml de diclorometano. La cromatografía en capa fina no detectó ningún B3OP en la disolución de reacción. Posteriormente, se ajustó el valor de pH con una disolución de KOH a pH 13 y se extrajo tres veces, cada una de ellas con 100 ml de diclorometano. Únicamente se pudo detectar una línea con B3AP en la cromatografía en capa fina. Se unificaron las fases orgánicas que contenían B3OP y B3AP, se secaron con sulfato de sodio carente de agua y posteriormente se evaporó el agente de solubilización. A continuación, se tomaron los espectros ^{1}H y ^{13}C-RMN (300 MHz).

Se obtuvieron 103,6 mg de Boc-3-pirrolidona que correspondieron a una conversión de 44 +/- 5 % como producto de cetona. Además, se obtuvo alanina de producto amina. Se comprueba que la retirada selectiva de la alanina de producto de amina, por ejemplo mediante reacción enzimática con alanina deshidrogenasa, resulta útil ya que minimiza la inhibición provocada por la alanina generada, la que a su vez se puede usar con el fin de usar concentraciones elevadas de la amina como educto. Lo mismo sigue siendo cierto para el uso de acetona.

Se puede aumentar la velocidad de conversión por medio del uso de acetona de receptor de amina, lo que - tras haber sido convertida en isopropilamina de producto de amina - se puede retirar a presión reducida del producto de reacción.

Ejemplo 4: Resolución óptica de una mezcla racémica de 1-N-bencil-3-aminopirrolidina (Be3AP) con transaminasa de Vibrio fluvialis

Se introdujeron en un recipiente de reacción de 1,5 ml:

- 10 μl de una disolución de (R,S)-Be3AP en DMSO (concentración final de 5 mM)
- 20 μl de fosfato de piridoxal, 10 mM (concentracion final 0,2 mM)
- 100 μl de piruvato, 100 mM (concentración final de 10 mM)
- 830 μl de tampón de fosfato de sodio, 50 mM, pH 8

Se comenzó la reacción mediante adición de 40 μl de transaminasa-Vibrio fluvialis. Esto corresponde a 7 U/ml . Tras 0 min., 10 min., 30 min. y 60 min se tomaron muestras.

La Tabla 1 muestra el progreso de la reacción y la pureza óptica.

Tiempo [min]	Exceso enantiomérico de (R)-Be3AP [% de ee_R]	Concentración de Be3AP [mM]	Conversión [%]
0	0	5	0
10	63	2,3	54
30	96	1,55	69
60	95	0,85	83

Exceso enantiomérico [% ee_R] de enantiomero (R) en %.

Los datos muestran que la transaminasa Vfl convierte Be3AP con elevada actividad.

Ejemplo 5: Resolución óptica de mezcla racémica de (R,S)-Cbz-3-aminopirrolidina (C3AP) con transaminasa de Vibrio fluvialis

Se introdujeron en un recipiente de reacción de 1,5 ml:

- 10 µl de una disolución de (R,S)-C3AP en DMSO (concentración final de 5 mM)
- 20 µl de fosfato de piridoxal, 10 mM (concentracion final 0,2 mM)
- 100 µl de piruvato, 100 mM (concentración final de 10 mM)
- 830 µl de tampón de fosfato de sodio, 50 mM, pH 8

Se comenzó la reacción mediante adición de 40 µl de transaminasa-Vibrio fluvialis. Esto corresponde a 7 U/ml . Tras 0 min., 10 min., 30 min. y 60 min se tomaron muestras.

Después de 10 minutos para (R)-C3AP se determinó un exceso enantiomérico de enantiomero (R) de 97,3 % ee_R en la muestra. Tras 30 minutos, no se pudo detectar enantiomero (S)

Ejemplo 6: Resolución óptica de una mezcla racémica de (R,S)-1-N-boc-3-aminopiperidina (B3APi) con transaminasa de Vibrio fluvialis

Se introdujeron en un recipiente de reacción de 1,5 ml:

- 100 µl de una disolución de hidrocloruro de (R,S)-B3APi en agua (concentración final de 5 mM)
- 20 µl de fosfato de piridoxal, 10 mM (concentracion final 0,2 mM)
- 100 µl de piruvato, pH 8, 100 mM (concentración final de 10 mM)
- 580 µl de tampón de fosfato de sodio, 50 mM, pH 8

Se comenzó la reacción mediante adición de 200 µl de transaminasa-Vibrio fluvialis. Esto corresponde a 35 U/ml . Tras 10 min., 30 min., 60 min., 2 horas, 4 horas y 18 horas se tomaron muestras.

Trascurridas 4 horas se logró un exceso enantiomérico del 96,3 % de ee_S. La conversión fue del 55 +/- 5 %. Aunque fue necesario usar una gran cantidad de la enzima, se pudo comprobar que es posible usar transaminasa de Vibrio fluvialis para la resolución óptica de (R,S)-B3APi.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una amina quiral ópticamente activa que comprende:

a) proporcionar una molécula que contiene un grupo ceto y una mezcla racémica de 3-aminopirrolidina (3AP) o 3-aminopiperidina (3APi), que porta cada uno un grupo protector en el átomo de nitrógeno de anillo,
b) hacer reaccionar la molécula que contiene un grupo ceto y la mezcla racémica de la amina con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva con el código de clasificación EC 2.6.1.18 y
c) obtener una amina quiral ópticamente activa, un producto de amina y un producto de cetona.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo protector es bencilo, tert-butoxicarbonilo (Boc) o carbobenzoxi (Cbz).

3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la molécula que contiene un grupo ceto está seleccionada entre el grupo que consiste en ácido fenilpirúvico, una de sus sales, ácido pirúvico, una de sus sales, ácido glioxílico, una de sus sales, acetofenona, ácido 2-cetoglutárico, una de sus sales, acetona, ácido 3-oxobutírico, una de sus sales, 2-butanona, 3-oxopirrolidina (3OP), (3-piridil)metilcetona (3-PMK), éster etílico de ácido 3-oxobutírico (3-OBEE) y éster metílico de ácido 3-oxopentanoico (3-OPME).

4. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de amina obtenido es una amina primaria o un aminoácido.

5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la transaminasa (R)- o (S)-selectiva es una transaminasa (R)- o (S)-selectiva de *Vibrio fluvialis, Alcaligenes denitrificans, Klebsiella pneumoniae o Bacillus thuringiensis.*

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de amina y/o el producto de cetona obtenidos en la etapa c) se retira, en una etapa de proceso adicional d), de la mezcla de reacción por medio de reacción con una enzima, por medio de descarboxilación espontánea, por medio de extracción o por medio de evaporación.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enzima usada en la etapa d) es una descarboxilasa, una sintasa o una deshidrogenasa.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la enzima es una alcohol deshidrogenasa (ADH).

9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la amina quiral ópticamente activa obtenida en las etapas c) o d) se retira de la mezcla de reacción obtenida en las etapas c) o d).

10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo protector de 3AP 1-N-protegida o 3APi 1-N-protegida obtenido en las etapas c) o d) se retira por medio de un método de desprotección.

11. Un proceso para la preparación de un compuesto fisiológicamente activo seleccionado entre el grupo de derivados de 3-aminopirrolidona, cefalosporina, derivados de cefalosporina, ácidos borónicos heterocíclicos, L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa), α-metildopa, D-fenilglicina, β-hidroxifenilglicina, fosfinotricina, derivados piramido y derivados pirrolidona, en el que se usa el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.