

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 488**

51 Int. Cl.:

C07D 257/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10823619 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2488505**

54 Título: **Método para la preparación de éster (R)-1-aryl-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico**

30 Prioridad:

15.10.2009 US 251867 P

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

25.05.2015

73 Titular/es:

**SK BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD. (100.0%)
99 Seorin-dong Jongro-gu
Seoul 110-110, KR**

72 Inventor/es:

**LIM, SANG CHUL;
UHM, MOO YONG;
LEE, DAE WON;
KIM, HUI HO;
LEE, DONG HO y
LEE, HYUN SEOK**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 536 488 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).

Método para la preparación de éster (R)-1-aril-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico**Descripción****5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la preparación de éster (R)-1-aril-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para preparar éster (R)-1-aril-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico, que comprende la reducción enzimática enantioselectiva de una arilcetona.

10

Técnica anterior

Como se ha desvelado en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2006/0258718 A1, los ésteres (R)-1-aril-2-tetrazolil-etílicos del ácido carbámico (denominados en lo sucesivo "los compuestos de carbamato") con actividad anticonvulsiva son útiles en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central, que incluyen especialmente ansiedad, depresión, convulsión, epilepsia, migrañas, trastorno bipolar, toxicomanía, tabaquismo, ADHD, obesidad, trastornos del sueño, dolor neuropático, accidentes cerebrovasculares, deterioro cognitivo, neurodegeneración, accidentes cerebrovasculares y espasmos musculares.

15

Dependiendo de la posición de N en el resto de tetrazol de los mismos, los compuestos de carbamato se dividen en dos isómeros de posición: tetrazol-1-ilo (denominados en lo sucesivo "1N tetrazol") y tetrazol-2-ilo (denominados en lo sucesivo "2N tetrazol"). La introducción de tetrazol para la preparación de los compuestos de carbamato produce una mezcla 1:1 de los dos isómeros de posición que se requiere que sean individualmente aislados para uso farmacéutico.

20

Teniendo quiralidad, los compuestos de carbamato deben tener alta pureza óptica, además de pureza química ya que se usan como medicaciones. El documento WO2010/150946 describe un método para la preparación de éster (R)-1-aril-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico, que comprende la reducción asimétrica de una arilcetona. Matsuda y col. (Tetrahedron Asymmetry, 20(5), 2009, 513-557) proporcionan una revisión de procesos biocatalíticos para la oxidación y reducción asimétrica.

25

La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2006/0258718 A1 usa el enantiómero puro (R)-aril-oxirano como material de partida que se convierte en un producto intermedio de alcohol mediante una reacción de apertura de anillo por tetrazol en presencia de una base adecuada en un disolvente, seguido de introducir un grupo carbamoilo en el producto intermedio de alcohol. Para el aislamiento y purificación de los isómeros de posición 1N y 2N así producidos, se establece cromatografía en columna después de la formación de un producto intermedio de alcohol o carbamato.

30

Para su uso en la preparación, puede sintetizarse (R)-2-aril-oxirano a partir de un material ópticamente activo, tal como derivado de ácido (R)-mandélico sustituido, mediante diversas vías u obtenerse por reacción de formación de anillos por reducción asimétrica de α -haloarilcetona o por separación de mezcla racémica de 2-aril-oxiranos en sus enantiómeros individuales. Como tal, el (R)-2-aril-oxirano es un compuesto caro.

35

Además, la reacción de apertura de anillo de (R)-2-aril-oxirano con tetrazol se realiza a temperaturas relativamente altas debido a la baja nucleofilia del tetrazol. Sin embargo, la reacción de apertura de anillo incluye el riesgo altamente probable de una reacción fuera de control debido a que los tetrazoles empiezan a degradarse espontáneamente a 110 ~ 120 °C.

40

En términos de una selección de reacción, como hay dos sitios de reacción en cada (R)-2-aril-oxirano y tetrazol, la reacción de apertura de anillo entre ellos proporciona la sustitución de 1N- o 2N-tetrazol en la posición de bencilo o terminal, produciendo una mezcla de un total de 4 isómeros de posición. Por tanto, los isómeros de posición individuales tienen bajo rendimiento de producción y son difíciles de aislar y purificar.

45

Divulgación de la invención

50

Problema técnico

Un aspecto de la presente invención proporciona un método novedoso para preparar éster (R)-1-aril-2-tetrazolil-etílico.

55

Solución al problema

Con el fin de realizar el aspecto anterior, la presente invención proporciona un método para preparar éster(R)-1-aril-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico, representado por la Fórmula química 1, que comprende: someter una arilcetona, representada por la Fórmula química 2, a reducción enzimática enantioselectiva; y carbamatar un compuesto de alcohol de configuración (R), representado por la Fórmula química 3:

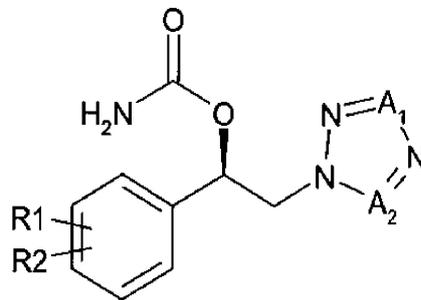
60

[Fórmula Química 1]

5

10

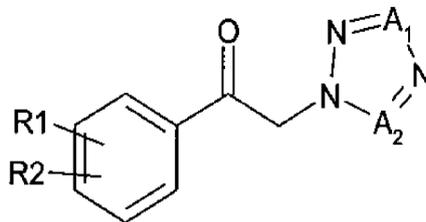
15



[Fórmula Química 2]

20

25

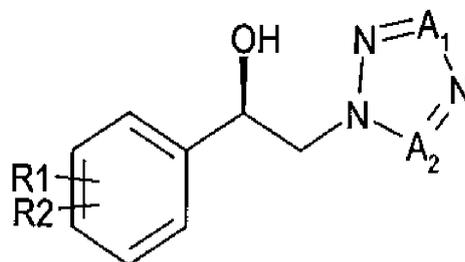


[Fórmula Química 3]

30

35

40



45 en las que

50 R_1 y R_2 están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono; y uno de A_1 y A_2 es CH, siendo el otro N.

Efectos ventajosos de la invención

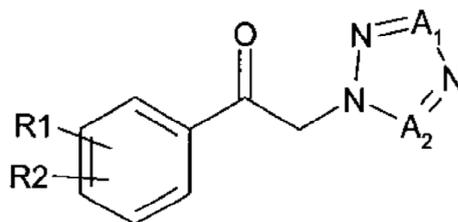
55 Según un aspecto de la presente invención, pueden fabricarse económicamente compuestos de carbamato con alta pureza óptica y alta pureza química.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

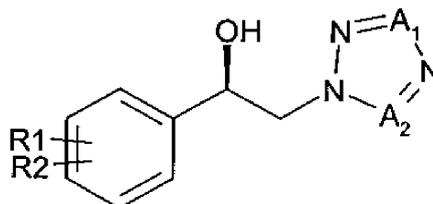
60 Otro aspecto de la presente invención proporciona un método novedoso para preparar un compuesto de alcohol, representado por la siguiente Fórmula química 3, mediante la reducción enzimática enantioselectiva de una arilcetona, representada por la siguiente Fórmula química 2:

65

[Fórmula Química 2]



[Fórmula Química 3]



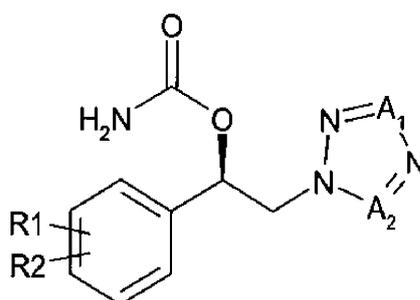
en las que

- 25 R_1 y R_2 están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, un alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, un tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y un alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono;
- 30 uno de A_1 y A_2 es CH, siendo el otro N; y dicha reducción se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende dicho compuesto de Fórmula química 2, una oxidoreductasa que tiene al menos el 90 % de homología con las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4, NADH o NADPH como cofactor que se oxida durante el proceso de reducción y se regenera continuamente, un co-sustrato que comprende un alcohol secundario representado por la fórmula R_xR_yCHOH en la que R_x representa carbono siendo x un número entero de 1-10 y R_y representa hidrógeno siendo y un número entero igual a dos veces el valor de x más dos, y un tampón adecuado.
- 35

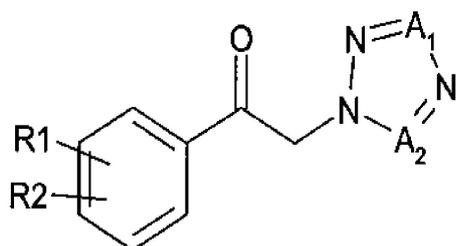
Según una realización de la presente invención, se proporciona un método que comprende la reducción enantioselectiva de una arilcetona representada por la siguiente Fórmula química 2 y la carbamatación de un compuesto de alcohol representado por la siguiente Fórmula química 3 para la preparación de éster (R)-1-aryl-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico, representado por la siguiente Fórmula química 1.

40

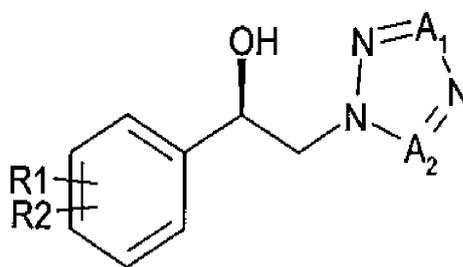
[Fórmula Química 1]



[Fórmula Química 2]



[Fórmula Química 3]

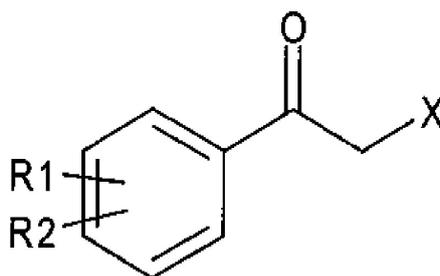


en las que

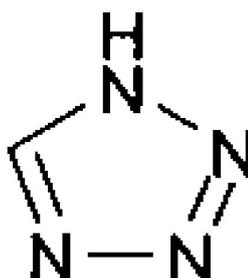
R₁ y R₂ están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono; y uno de A₁ y A₂ es CH, siendo el otro N.

La arilcetona de Fórmula química 2, útil como material de partida en el método de preparación de la presente invención, puede sintetizarse, por ejemplo, por una reacción de sustitución entre la arilcetona de Fórmula química 4 y el tetrazol de Fórmula química 5:

[Fórmula Química 4]



[Fórmula Química 5]



en las que

R₁ y R₂ son como se han definido anteriormente; y X es un grupo saliente tal como un haluro o sulfonato.

Se facilita una ventaja económica a la síntesis de la arilcetona de Fórmula química 2 a partir de los compuestos representados por las Fórmulas químicas 4 y 5 debido a que son compuestos baratos comercialmente disponibles. Además, la reacción de sustitución puede llevarse a cabo en condiciones relativamente suaves, en comparación con la reacción de apertura de anillo entre (R)-2-aril-oxirano y tetrazol. Por tanto, el método según la presente invención tiene algo de seguridad de proceso aunque emplea tetrazol potencialmente explosivo, y garantiza alto rendimiento de producción y fácil purificación, con la producción de isómeros de posición necesarios en posiciones de bencilo.

La arilcetona representada por la Fórmula química 2 que puede sintetizarse por la reacción de sustitución con

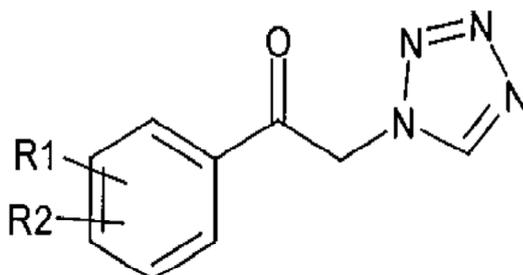
tetrazol puede estar en una mezcla de isómeros de posición que incluye 1N arilcetona de la siguiente Fórmula química 2a y 2N arilcetona de la siguiente Fórmula química 2b, que pueden aislarse y purificarse mediante cristalización comercialmente disponible.

5

[Fórmula Química 2a]

10

15

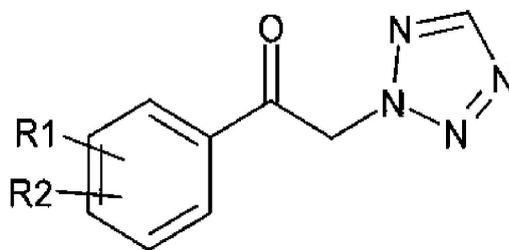


20

[Fórmula Química 2b]

25

30



35

La cristalización útil en la presente invención puede comprender añadir un agente solubilizante al producto de la reacción de sustitución, es decir, una mezcla de los isómeros de posición, y luego añadir un agente precipitante. Opcionalmente, la cristalización puede comprender además, después de la precipitación, filtrar el precipitado, concentrar el filtrado y añadir un agente precipitante adicional.

40

Ejemplos no limitantes ilustrativos del agente solubilizante incluyen acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, 1,4-dioxano y alcoholes inferiores de 1 a 4 átomos de carbono, o combinaciones de los mismos. El agente solubilizante puede usarse en una cantidad de 0 a 20 ml (v/p) basado en el peso (g) de la mezcla de los isómeros de posición. Como se usa en el presente documento, la adición del agente solubilizante en una cantidad de cero ml (v/p) pretende significar añadir inmediatamente el siguiente agente precipitante sin dilución del filtrado.

45

Ejemplos del agente precipitante incluyen agua, alcohol C1-C4 inferior, éter dietílico, pentano, hexano, ciclohexano, heptano o combinaciones de los mismos, pero no se limitan a éstos. El agente precipitante puede añadirse lentamente en una cantidad de cero a 40 ml (v/p) basado en el peso (g) de la mezcla de isómeros de posición. Como se usa en el presente documento, la adición del agente precipitante en una cantidad de cero ml pretende significar dejar o enfriar para dar precipitados sin la adición del agente precipitante.

50

La filtración de los precipitados así obtenidos mediante la adición del agente precipitante da la 1N arilcetona de Fórmula química 2a como un cristal con alta pureza.

55

Por otra parte, el filtrado así obtenido después de la etapa de filtración puede concentrarse para aumentar la relación del agente precipitante con respecto al agente solubilizante, dando así la 2N arilcetona de Fórmula química 2b con alta pureza. La relación de concentración del filtrado puede determinarse adecuadamente por aquellos expertos habituales en la materia. Por ejemplo, la concentración se lleva hasta que el disolvente sea haya eliminado totalmente, a continuación se añaden el agente solubilizante y el agente precipitante como se ha mencionado anteriormente.

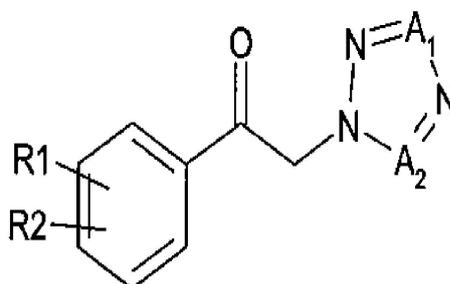
60

A diferencia de la cromatografía en columna, esta cristalización puede usarse comercialmente sin mucha dificultad.

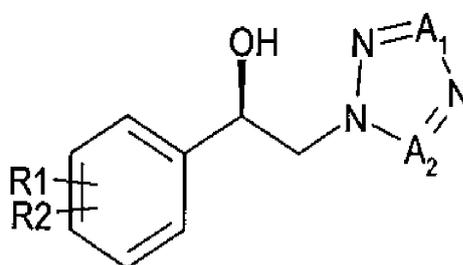
La reducción enzimática enantioselectiva permite la conversión de la arilcetona de Fórmula química 2 en el compuesto de alcohol con configuración (R), representado por la siguiente Fórmula química 3.

65

[Fórmula Química 2]



[Fórmula Química 3]



en las que

R_1 y R_2 están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, un alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, un tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono; y uno de A_1 y A_2 es CH, siendo el otro N.

La reducción enzimática enantioselectiva puede realizarse usando una enzima oxidoreductasa en suspensión en la mezcla de reacción, o inmovilizada de un modo convencional. La enzima puede utilizarse en un estado completamente purificado, en un estado parcialmente purificado, o en células microbianas en las que se expresó. Las propias células pueden estar en un estado nativo, un estado permeabilizado o un estado lisado. Se apreciará por aquellos expertos habituales en la materia que se prefiere el uso de la enzima en las células para la práctica del proceso de la invención, ya que representa un ahorro significativo en el coste. Lo más preferentemente, la enzima se expresa en *E. coli* y se usa como una suspensión de células nativas. El proceso de reducción enzimática de los compuestos de arilcetona de fórmula 2 puede realizarse en una mezcla de reacción que comprende dicho compuesto de fórmula 2, una oxidoreductasa, NADH o NADPH como cofactor, un co-sustrato y un tampón adecuado en el que la oxidoreductasa comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 60 % de los aminoácidos idénticos a una de las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4.

Se ha encontrado que los polipéptidos que comprenden una de secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4 o un polipéptido que comprende una secuencia de amino que es idéntica al menos el 90 % a una de las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4 y que poseen actividad de oxidoreductasa pueden usarse para reducir el compuesto de fórmula 2 al compuesto de fórmula 3 (configuración R) con alta conversión y alta selectividad enantiomérica. El exceso enantiomérico del R-alcohol formado en la enzimática enantioselectiva es al menos aproximadamente el 89 %, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 99 %.

El organismo que produce los polipéptidos de oxidoreductasa útiles en la reducción enzimática enantioselectiva puede ser una cepa natural o una variante y está seleccionado preferentemente de *Candida magnolia*, *Candida vaccinii* y *Oryctolagus cuniculus*. Se prefiere levadura del género *Candida* para producir las enzimas oxidoreductasa utilizadas en el presente proceso. Los derivados de los polipéptidos son aquellos que tienen al menos el sesenta por ciento de homología con las SEC ID facilitadas anteriormente y que poseen actividad de oxidoreductasa. Aquellos expertos en la materia saben que hay sistemas y tecnología disponible para determinar con exactitud la homología de secuencias.

Un polipéptido que comprende SEC ID N°: 1 puede codificarse por una secuencia de ADN de SEC ID N°: 5 que puede conseguirse, por ejemplo, del organismo *Oryctolagus cuniculus* depositado en las condiciones del Tratado de Budapest con la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124, bajo el

número DSMZ 22167, específicamente de DSMZ 22167 *de conejo*, o por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con la misma. Un polipéptido que comprende SEC ID N°: 2 puede codificarse por una secuencia de ADN de SEC ID N°: 6 que puede conseguirse, por ejemplo, del organismo *Candida magnoliae* DSMZ 22052, o por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con la misma.

Un polipéptido que comprende SEC ID N°: 3 puede codificarse por una secuencia de ADN de SEC ID N°: 7, que puede conseguirse, por ejemplo, del organismo *Candida vaccinii* CBS7318, o por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con la misma. Un polipéptido que comprende SEC ID N°: 4 puede codificarse por una secuencia de ADN de SEC ID N°: 8, que puede conseguirse, por ejemplo, del organismo *Candida magnoliae* CBS6396, o por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con la misma.

La oxidorreductasa que tiene una de las secuencias de polipéptidos mencionadas anteriormente se obtiene en cantidades utilizables mediante procedimientos convencionales reconocidos por aquellos expertos en la materia. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos se clona en un vector adecuado y después se introduce en un organismo huésped que puede expresar el gen que codifica la secuencia. Microorganismos susceptibles de transformación capaces de expresar un péptido tal son muy conocidos en la técnica. Un microorganismo preferido es *Escherichia coli*. Como se ha establecido anteriormente, la oxidorreductasa expresada por *E. coli* transformada puede extraerse de las células de *E. coli* y purificarse parcialmente o completamente para su uso en el proceso, o puede utilizarse en las propias células que pueden estar en un estado nativo, permeabilizado o lisado. Una realización preferida de la reducción enzimática enantioselectiva utiliza una suspensión de la oxidorreductasa como células en el estado nativo. Cualquiera de estas formas puede utilizarse en la forma libre o inmovilizada.

La reacción de reducción puede llevarse a cabo en un sistema monofásico que tiene las células que contienen la enzima suspensas en él. Alternativamente, la reacción puede realizarse en un sistema acuoso/disolvente orgánico bifásico como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2009/0017510 y la patente de EE.UU. n° 7.371.903. La reacción puede llevarse a cabo como una reacción discontinua convencional, o como un proceso continuo. Se apreciará que una de las ventajas significativas de la reducción enzimática enantioselectiva para aplicaciones comerciales es aceptada para operación continua.

La mezcla de reacción contiene preferentemente de aproximadamente 35 g a 350 g de células por kg de reactante añadido. La suspensión es la porción acuosa de la mezcla de reacción que también contiene un tampón, por ejemplo, un tampón TEA (trietanolamina), fosfato, Tris/HCl o glicina. El tampón puede comprender adicionalmente iones para la estabilización de la enzima, por ejemplo, una fuente de iones magnesio. Aditivos adicionales que pueden estar presentes en el tampón para estabilizar las enzimas pueden incluir un poliol, tal como glicerol, sorbitoles y similares, compuestos de azufre, tales como 1,4-DL-ditiotreitol, glutatión, cisteína o similares, aminoácidos y péptidos, o detergentes, tales como DMSO. Un estabilizador preferido para la enzima es un poliol, particularmente glicerol, que puede estar presente de aproximadamente el 10 % al 80 % en peso, preferentemente aproximadamente el 50 % en peso, basado en el peso de la suspensión de células.

El proceso de reducción enzimática enantioselectiva se lleva a cabo ventajosamente usando un principio de sustrato acoplado en el que la mezcla de reacción utiliza un co-sustrato para la regeneración del cofactor, o coenzima, que funciona proporcionando hidrógeno para la reducción del sustrato de arilcetona. El cofactor es preferentemente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) o nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), que se utilizan en el estado reducido, es decir, NADPH o NADH, respectivamente. El cofactor está presente en la mezcla de reacción en una concentración de aproximadamente 0,01 mM a 5 mM, preferentemente 0,05 mM a 0,5 mM. En la reacción, el co-sustrato funciona siendo oxidado en la regeneración del cofactor NADPH o NADH. El co-sustrato es un alcohol secundario representado por la fórmula R_xR_yCHOH en la que R_x representa carbono siendo x un número entero de 1-10 y R_y representa hidrógeno siendo y un número entero igual a dos veces el valor de x más dos. Ejemplos de co-sustratos adecuados incluyen 2-propanol, 2-butanol 4-metil-2-pentanol, 2-pentanol, 2-heptanol, 2-octanol y similares. Un co-sustrato preferido es 2-butanol. El co-sustrato está presente en la mezcla de reacción en de aproximadamente el 10 % al 80 % en volumen, preferentemente de aproximadamente el 40 % al 60 % en volumen, lo más preferentemente aproximadamente el 50 % en volumen.

El cofactor oxidado formado durante la reducción de la arilcetona se regenera por oxidación del co-sustrato, que también puede catalizarse por la oxidorreductasa. Así, una ventaja económica particular del presente proceso es que la oxidorreductasa afecta tanto la reducción de la arilcetona de fórmula 1 como la oxidación del co-sustrato, por tanto no tiene que usarse más enzima para la regeneración del cofactor. También está dentro del alcance de la presente invención añadir otra enzima a la mezcla de reacción para la regeneración del cofactor con el fin de potenciar la tasa de reducción de la arilcetona.

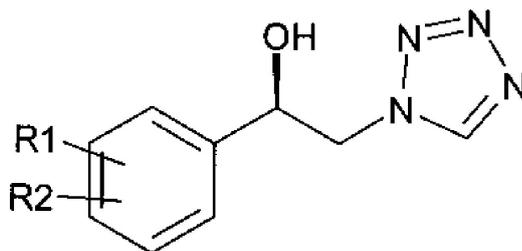
En otra realización, un disolvente orgánico que no participa en la regeneración del cofactor puede añadirse a la mezcla de reacción y realizarse el proceso de reducción en el sistema bifásico orgánico acuoso. Ejemplos de tales disolventes incluyen, sin pretender la limitación, éter dietílico, terc-butil metil éter, éter diisopropílico, éter dibutílico, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano. Un disolvente tal puede estar presente en de aproximadamente el 1 % al 50 % en volumen, basado en el volumen de la mezcla de reacción.

La cantidad de sustrato de arilcetona en la mezcla de reacción es preferentemente superior a aproximadamente el 0,1 % en peso y puede aumentarse a aproximadamente el 50 % en peso, siendo una concentración preferida de aproximadamente el 5 al 30 % en peso. La cantidad de sustrato variará dependiendo de la pureza del mismo, ya que el proceso puede llevarse a cabo con el sustrato en un estado purificado o como producto en bruto que contiene cantidades y tipos variables de impurezas. El pH de la mezcla de reacción después de la adición de todos los componentes estará en el intervalo de 5 a 10, preferentemente de 7 a 9, y óptimamente aproximadamente pH 8. La reducción enzimática según la presente invención se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 10-45 °C, preferentemente de aproximadamente 20-40 °C, lo más preferentemente de aproximadamente 25-35 °C.

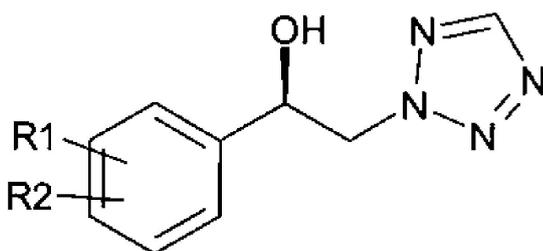
El proceso de reducción enantioselectiva es rentable y respetuoso con el medioambiente, además de proporcionar los alcoholes de fórmula 3 con rendimiento alto y enantioselectividad muy alta. Así, puede obtenerse un compuesto de alcohol con una configuración (R) de alta pureza óptica en presencia de la enzima bajo las condiciones de reacción anteriormente mencionadas en el plazo de aproximadamente 12 a 96 horas, preferentemente de aproximadamente 24 a 48 horas. Durante la incubación, el pH de la mezcla se mantiene dentro de los intervalos facilitados anteriormente probando periódicamente y la adición de un reactivo ácido o básico convencional, por ejemplo, carbonato sódico e hidróxido sódico, respectivamente. La eficiencia de la reducción enzimática enantioselectiva puede expresarse por el número de renovaciones total (TTN) que es los moles del alcohol quiral de fórmula 2 producidos por mol de cofactor inicialmente añadido. El TTN de la reducción enzimática enantioselectiva es de aproximadamente 10^2 a 10^5 , preferentemente $\geq 10^3$.

Si el compuesto de alcohol obtenido mediante la reducción enzimática enantioselectiva existe como mezcla de isómeros de posición de 1N alcohol de la Fórmula química 3a y 2N alcohol de la Fórmula química 3b, puede aislarse y purificarse en isómeros de posición individuales de alta pureza por cristalización:

[Fórmula Química 3a]



[Fórmula Química 3b]



La cristalización puede comprender añadir un agente solubilizante a la mezcla de isómeros de posición resultante de la reducción; y añadir un agente precipitante, y opcionalmente filtrar el precipitado; y concentrar el filtrado y añadir un agente precipitante adicional.

Ejemplos del agente solubilizante útiles en la cristalización incluyen acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, 1,4-dioxano, alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono, y una mezcla de los mismos, pero no se limitan a éstos. El agente solubilizante puede añadirse en una cantidad de cero a 20 ml (v/p) basado en el peso (g) de la mezcla de isómeros de posición.

Ejemplos no limitantes del agente precipitante incluyen agua, un alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono, éter dietílico, pentano, hexano, ciclohexano, heptano, y una mezcla de los mismos. El agente precipitante puede añadirse lentamente en una cantidad de cero a 40 ml (v/p) basado en el peso (g) de la mezcla de isómeros de posición.

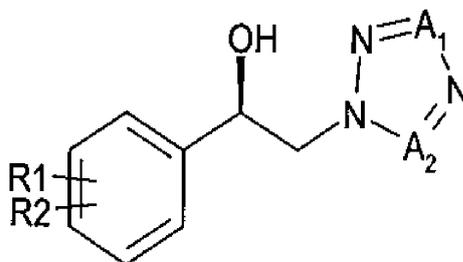
Tras la adición del agente precipitante, la filtración puede dar 1N alcohol (3a) como precipitado de alta pureza.

Además, el 2N alcohol (3b) puede obtenerse como una forma cristalina de pureza muy alta concentrando el filtrado y aumentando la relación del agente precipitante con respecto al agente solubilizante.

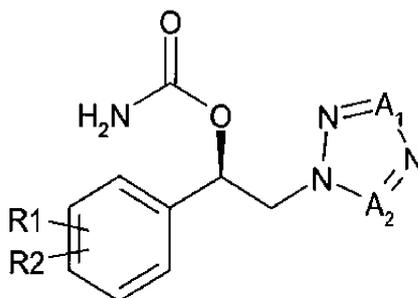
Estas etapas de cristalización pueden omitirse cuando los isómeros de posición de arilcetona de Fórmula química 2 ya están aislados y purificados.

- 5 La introducción de un resto carbamoilo en el compuesto de alcohol con configuración (R) de Fórmula química 3 conduce a carbamato con configuración (R), representado por la Fórmula química 1:

[Fórmula Química 3]



[Fórmula Química 1]



35 en las que

40 R_1 y R_2 están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, un alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, un tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y un alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono; y uno de A_1 y A_2 es CH, siendo el otro N.

En la etapa de carbamatación puede emplearse, por ejemplo, cianato inorgánico-ácido orgánico, isocianato-agua, o compuesto de carbonilo-amoniaco para introducir un resto carbamoilo.

- 45 Para la carbamatación con cianato inorgánico-ácido orgánico, el compuesto de alcohol con configuración (R) de Fórmula química 3 se disuelve en un disolvente orgánico, por ejemplo, éter dietílico, tetrahydrofurano, 1,4-dioxano, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, o una mezcla de los mismos, y se mezcla con 1 a 4 equivalentes de cianato inorgánico tal como cianato de sodio y ácido orgánico, tal como ácido metanosulfónico o ácido acético, seguido de hacer reaccionar a aproximadamente -10 a 70 °C.

- 50 Con respecto al uso del isocianato-agua, se añaden 1 a 4 equivalentes de isocianato, por ejemplo, isocianato clorosulfónico, isocianato de tricloroacetilo, isocianato de trimetilsililo, a una disolución del compuesto de alcohol con configuración (R) de Fórmula química 3 en un disolvente orgánico, por ejemplo, éter dietílico, tetrahydrofurano, 1,4-dioxano, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, o una mezcla de los mismos, y se hace reaccionar a aproximadamente -50 a 40 °C. Posteriormente, sin purificación, se añaden 1 a 20 equivalentes de agua para inducir la hidrólisis.

- 55 Con respecto al uso del compuesto de carbonilo-amoniaco, se añaden 1 a 4 equivalentes de un compuesto de carbonilo, por ejemplo, 1,1'-carbonildiimidazol, cloruro de carbamoilo, carbonato de disuccinilo, fosgeno, trifosgeno, o cloroformiato, a una disolución del compuesto de alcohol con configuración (R) de Fórmula química 3 en un disolvente orgánico, por ejemplo, éter dietílico, tetrahydrofurano, 1,4-dioxano, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, o una mezcla de los mismos, y se hace reaccionar a aproximadamente -10 a 70 °C, seguido de añadir 1 a 10 equivalentes de amoniaco sin purificación.

- 65 Después de la carbamatación, el compuesto de carbamato de Fórmula química 1 así obtenido puede purificarse dando mayor pureza óptica y química mediante la siguiente cristalización. La cristalización comprende añadir un

agente solubilizante al producto de la carbamatación; y a continuación añadir un agente precipitante, y opcionalmente filtrar el precipitado y añadir un agente precipitante adicional. Para uso farmacéutico, es preferible que siempre haya una purificación final del producto carbamatado antes de uso, pero que pueda haber una etapa de cristalización anterior en el proceso.

5 Ejemplos no limitantes del agente solubilizante incluyen acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, 1,4-dioxano, alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono, y una mezcla de los mismos. Basado en el peso (g) del producto de reacción, el agente solubilizante puede usarse en una cantidad de cero a 20 ml (v/p).

10 Ejemplos no limitantes del agente precipitante incluyen agua, alcoholes inferiores de 1 a 4 átomos de carbono, éter dietílico, pentano, hexano, ciclohexano, heptano y una mezcla de los mismos. Basándose en el peso (g) del producto de reacción, el agente precipitante puede añadirse lentamente en una cantidad de cero a 40 ml (v/p).

15 Comprendiendo reducción enzimática enantioselectiva, el método de la presente invención puede proporcionar compuestos de carbamato de alta pureza óptica. Además, las suaves condiciones de reacción que el método de la presente invención requiere garantizan la seguridad del proceso. Además, la etapa de cristalización aplicable a la producción a gran escala antes o después de la reducción enzimática enantioselectiva o después de la carbamatación produce una mayor pureza química de los compuestos de carbamato. Los compuestos de carbamato
20 preparados según la presente invención son muy útiles en el tratamiento de trastornos del SNC tales como convulsión.

Modo para la invención

25 Puede obtenerse un mejor entendimiento de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como limitantes, de la presente invención.

Ejemplo de preparación 1: Preparación de

30 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-1-il)etan-1-ona

A una suspensión de 2-bromo-2'-cloroacetofenona (228,3 g, 0,978 moles) y carbonato de potasio (161,6 g, 1,170 moles) en acetonitrilo (2000 ml) se añadió una disolución al 35 % p/p de 1H-tetrazoldimetilformamida (215,1 g, 1,080 moles) a temperatura ambiente. Estos reactivos se agitaron durante 2 h a 45 °C y se destilaron a presión reducida para eliminar aproximadamente 1500 ml del disolvente. El concentrado se diluyó en acetato de etilo (2000 ml) y se lavó con 10 % de salmuera (3 x 2000 ml). La fase orgánica así separada se destiló a presión reducida proporcionando 216,4 g de un residuo sólido aceitoso. A una disolución del residuo sólido en acetato de etilo (432 ml) se añadió lentamente heptano (600 ml). El precipitado así formado se filtró a temperatura ambiente y se lavó dando 90,1 g (0,405 moles) de 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-1-il)etan-1-ona (denominada en lo sucesivo 1N
40 cetona).

RMN ¹H (CDCl₃) 8,87(s, 1H), d7,77(d, 1H), d7,39-7,62(m, 3H), d5,98(s, 2H)

Ejemplo de preparación 2: Preparación de

45 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ona

Después de la filtración del Ejemplo de preparación 1, el filtrado se concentró y se disolvió en isopropanol (100 ml), y entonces se añadió heptano (400 ml) para completar la cristalización. La filtración y el lavado a 5 °C proporcionaron 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ona (denominada en lo sucesivo "2N cetona") como un sólido. 94,7 g
50 (0,425 moles).

RMN ¹H (CDCl₃) d8,62(s, 1H), d7,72(d, 1H), d7,35-7,55(m, 3H), d6,17(s, 2H)

EJEMPLO DE PREPARACIÓN 3: Preparación del compuesto de alcohol de configuración (R) por reducción enzimática enantioselectiva mediante diversas oxidorreductasas

55 Se prepararon las cuatro siguientes disoluciones del siguiente modo:

Disolución de enzima 1

60 Se transformaron células StarBL21(De3) de *Escherichia coli* competentes (Invitrogen) con las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa de SEC ID N° 1. A continuación, las colonias de *Escherichia coli* transformadas con las construcciones de expresión resultantes se cultivaron en 200 ml de medio LB (1 % de triptona, 0,5 % de levadura y 1 % de cloruro sódico) con 50 microgramos/ml de ampicilina o 40 microgramos/ml de kanamicina, respectivamente, hasta que se logró una densidad óptica de 0,5, medida a 550 nm. La expresión de la proteína recombinante deseada se indujo mediante la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) a una concentración de 0,1 mM. Después de 16 horas de inducción a 25 °C y 220 rpm, las células se recogieron y se congelaron a -20

°C. En la preparación de las disoluciones de enzima, se resuspendieron 30 g de células en 150 ml de tampón trietanolamina (TEA 100 nM, MgCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, pH 8) y se homogeneizaron en un homogeneizador a alta presión. La disolución de enzima resultante se mezcló con 150 ml de glicerol y se guardó a -20 °C.

5 Disolución de enzima 2

Se transformaron células RB791 (disolución madre genética de *E. coli*, Yale, EE.UU.) con las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa de SEC ID N° 2. A continuación, las colonias de *Escherichia coli* transformadas con las construcciones de expresión resultantes se cultivaron en 200 ml de medio LB (1 % de triptona, 0,5 % de levadura y 1 % de cloruro sódico) con 50 microgramos/ml de ampicilina o 40 microgramos/ml de kanamicina, respectivamente, hasta que se logró una densidad óptica de 0,5, medida a 550 nm. La expresión de la proteína recombinante deseada se indujo mediante la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) a una concentración de 0,1 mM. Después de 16 horas de inducción a 25 °C y 220 rpm, las células se recogieron y se congelaron a -20 °C. En la preparación de las disoluciones de enzima, se resuspendieron 30 g de células en 150 ml de tampón trietanolamina (TEA 100 nM, MgCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, pH 8) y se homogeneizaron en un homogeneizador a alta presión. La disolución de enzima resultante se mezcló con 150 ml de glicerol y se guardó a -20 °C.

Disolución de enzima 3

Se preparó la Disolución de enzima 3 del mismo modo que se ha descrito en la Disolución de enzima 1, excepto que se usaron las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa de SEC ID N° 3 en lugar de las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa de SEC ID N° 1.

Disolución de enzima 4

Se preparó la Disolución de enzima 4 del mismo modo que se ha descrito en la Disolución de enzima 2, excepto que se usaron las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa de SEC ID N° 4 en lugar de las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa de SEC ID N° 2.

Las diferentes oxidorreductasas contenidas en cada Disolución de enzima 1 a 4 se examinaron del siguiente modo para la conversión de 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-1-il)etan-1-ona (1N cetona) y 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ona (2N cetona) en el 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-1-il)etan-1-ol (denominado en lo sucesivo 1N alcohol) y 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ol (denominado en lo sucesivo "2N alcohol") correspondiente, respectivamente.

Lote de reacción A

160 µl de tampón (TEA 100 nM, MgCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, pH 8)
 100 µl de NADPH (40 mg/ml)
 40 µl de 2-propanol
 50 µl de Disolución de enzima 1
 2 mg de 1N cetona o 2N cetona

45 Lote de reacción B

160 µl de tampón (TEA 100 nM, MgCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, pH 8)
 100 µl de NADPH (40 mg/ml)
 40 µl de 2-propanol
 50 µl de Disolución de enzima 2
 2 mg de 1N cetona o 2N cetona

Lote de reacción C

350 µl de tampón (TEA 100 nM, MgCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, pH 8)
 0,05 mg de NADP
 50 µl de Disolución de enzima 3
 10 mg de 1N cetona o 2N cetona
 250 µl de 4-metil-2-pentanol
 50 µl de disolución de enzima (oxidorreductasa de *Thermoanaerobium brockii*) para la regeneración de cofactor

Lote de reacción D

350 µl de tampón (TEA 100 nM, MgCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, pH 8)
 0,05 mg de NADP
 50 µl de Disolución de enzima 4

10 mg de 1N cetona o 2N cetona
 250 µl de 4-metil-2-pentanol
 50 µl de disolución de enzima (oxidoreductasa de *Thermoaneroibium Brockii*) para la regeneración de cofactor

5 Después de 24 h de incubar cada lote de reacción A, B, C y D, se añadió 1 ml de acetonitrilo a cada lote de reacción, que se centrifugó y se transfirió a un recipiente de análisis de HPLC para el exceso enantiomérico y la conversión. La conversión y el valor de ee de los productos se enumeran en la Tabla 1 a continuación calculados usando las siguientes ecuaciones:

10
$$\text{Ratio de Conversión (\%)} = \frac{[\text{Área del Producto}]}{[\text{Área del Reactivo} + \text{Área del Producto}]} \times 100$$

$$\text{Valor-ee (\%)} = \frac{[\text{Área de Configuración-R} - \text{Área de Configuración-S}]}{[\text{Área de Configuración-R} + \text{Área de Configuración-S}]} \times 100$$

15 Tabla 1

[Tabla 1]

Lote de reacción empleado	Conversión (% de cetona reducida)	Valores-ee %ee(enantiomero)	
		R-2N Alcohol ,2b	R-1N Alcohol, 2a
Lote de reacción A	>98	89(R)	>99(R)
Lote de reacción B	>98	>99(R)	>99(R)
Lote de reacción C	>98	95(R)	>99(R)
Lote de reacción D	>98	98(R)	95(R)

30 EJEMPLO DE PREPARACIÓN 4: Reducción enzimática mediante oxidoreductasa de SEC N°: 2 Para la conversión de 1N/2N cetona en R-1N/R-2N alcohol, se añadieron 30 µl de la disolución de enzima 2 que contiene la oxidoreductasa de SEC N°: 2 a una mezcla de 300 µl de un tampón (TEA 100 mM, pH 8, MgCl₂ 1 mM, 10 % de glicerol), 100 mg de una mezcla de 1N cetona y 2N cetona (1N:2N=14 %:86 %), 0,04 mg de NADP y 300 µl de 2-butanol. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente bajo agitación constante. Después de 48 horas, más del 98 % de las cetonas se redujeron a una mezcla de alcoholes de la siguiente composición (R-2N alcohol 80 %; S-2N alcohol 0 %; R-1N alcohol 20 %, S-1N alcohol 0 %; 1N cetona 0 %; 2N cetona 0 %).

35 Después del procesamiento general y la recristalización con acetato de etilo/hexano, se obtuvieron los alcoholes ópticamente puros como a continuación:

40 (R)-1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-1-il)etan-1-ol (1N alcohol)
 RMN ¹H (CDCl₃) δ8,74(s, 1H), δ7,21-7,63(m, 4H), δ5,57(m, 1H), δ4,90(d, 1H), δ4,50(d, 1H), δ3,18(d, 1H);
 (R)-1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ol (2N alcohol) RMN ¹H (CDCl₃) δ8,55(s, 1H), δ7,28-7,66(m, 4H), δ5,73(d, 1H), δ4,98(d, 1H), δ4,83(d, 1H), δ3,38(a, 1H).

45 Preparación de carbamato

Ejemplo de preparación 5: Preparación de éster

50 (R)-1-(2-clorofenil)-2-(tetrazol-2-il)etilico del ácido carbámico

Se añadieron 50 ml de la disolución de enzima 2 que contiene la oxidoreductasa de SEC N°: 2 a una mezcla de 250 ml de un tampón (TEA 100 mM, pH 8, MgCl₂ 1 mM, 10 % de glicerol), 50 g (225 mmoles) de 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ona (2N cetona), 4 mg de NAD, 300 ml de 2-propanol y 150 ml de acetato de butilo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 48 horas más del 98 % de la 2N cetona se redujo al (R)-1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ol correspondiente (R-2N alcohol) con valores >99 % de ee. A esta mezcla resultante se añadieron 500 ml de acetato de etilo. Después de separarse, la fase orgánica así formada se lavó con 10 % de salmuera (3 x 500 ml). La fase orgánica así formada se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró y el filtrado se destiló a presión reducida dando 50,4 g (224 mmoles) de 1-(2-clorofenil)-2-(1,2,3,4-tetrazol-2-il)etan-1-ol (R-2N alcohol, pureza óptica 99,9 %) como un residuo aceitoso. A este producto en bruto resultante se añadieron 450 ml de tetrahidrofurano. Después de enfriarse hasta -15 °C, se añadieron lentamente 38 g (267 mmoles) de isocianato de clorosulfonilo y se agitaron a -10 °C durante 2 h. La lenta adición del agua indujo la terminación de la reacción. La disolución resultante se concentró a presión reducida hasta que se eliminaron aproximadamente 300 ml del disolvente. El concentrado se diluyó con 600 ml de acetato de etilo y se lavó con 10 % de salmuera (3 x 500 ml). La fase orgánica se concentró a presión reducida y el concentrado se disolvió en

isopropanol (90 ml) al que se añadió lentamente heptano (180 ml), conduciendo a la completitud de la cristalización. El precipitado así obtenido se filtró y se lavó proporcionando 51,8 g (194 mmoles) de éster (R)-1-(2-clorofenil)-2-(tetrazol-2-il)etilico del ácido carbámico (pureza óptica 99,9 %).

RMN ¹H (acetona-d₆) δ8,74(s, 1H), δ7,38-7,54(m, 4H), δ6,59(m, 1H), δ6,16(a, 2H), δ4,90(d, 1H), δ5,09(m, 2H)

5 Como se ha descrito hasta ahora, los compuestos de carbamato con alta pureza óptica y química pueden producirse con un beneficio económico según la presente invención.

Listado de secuencias Texto libre

10 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

SEC ID N° 1: *Oryctolagus cuniculus* de DSMZ 22167 de conejo

15 1 massgvtrrd plankvaivt astdgiglai arllaqdgah vvissrkqqn vdravaalqa
61 eglsvtgtvc hvgkaedrer lvatalnlhg gidilvsnaa vnpffgklmd vteevwdkiil
121 dinvkamalm tkavvpemek rgggsvviva siaafnpfsg lgpynvskta lvgltknlal
20 181 elaaqnirvn clapglikts fskalwedka qeeniiqklr irrlgkpeec agivsflese
241 dasyitgetv vvaggspsrl

25 SEC ID N° 2: secuencia de proteínas carbonil reductasa de *Candida magnoliae* DSMZ 22052

1 msatsnalit gasrgmgeat aiklalegys vtlasrgieq lnaikeklpi vkkqqqhyvw
61 qlldlsdieaa stfkgaplpa ssydvffsna gvvdafpfad gsetaqkdlf tvnllspval
30 121 tktivkaiad kpretpahii ftssivgig vpvavysat kgaidsfars larefgpkni
181 hvncvnpgtt rtemtkgvdI aafgdvpikg wievdaiada vlflikskni tggslvvdng
241 fgv

35 SEC ID N° 3: secuencia de proteínas carbonil reductasa de *Candida vaccinii* CBS7318

1 mrstpnalvt ggsrgigaaa aiklaeagys vtlasrgldk lnevkalpv vkqqqehhvw
61 qlldlsdvqaa lefkgaplpa skydlfvsna gvafsfptae hddkdwqni avnltsplai
121 tkalvkavge rsndnfpqia flssaaalrg vpqtavysat kagldgfters lakelgpkgi
40 181 hvnivhpgwt qtetmagvde prdtpipgwi qpeaiaeaiv ylaksknitg tnivvdnglt
241 i

45 SEC ID N° 4: secuencia de proteínas carbonil reductasa de *Candida magnoliae* CBS6396

1 mnalvtggsr gigeaiatkl aedgysvtia srgidqlnkv kaklpvrvreg qthhvwqldl
61 sdaeaassfk gaplpassyd vlvnnagvtd pspiakqsds eihklfsvnl lspvaltkty
121 vqavtgkpre tpahiifiss gvairgypnv avysatksql dgfmrslare lgpegvhvnt
50 181 vspgltktem asgvslddfp pspigwiqp eaiadavryl vksknitgti lsvdngitv

SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

55 SEC ID N° 5: *Oryctolagus cuniculus* de DSMZ 22167 de conejo

60

65

1 atggcttcat ctggegtaac acgcegtgat ccgctggcca acaaagtcgc tattgtcact
 61 gcgtegaccg atggcatcgg actggcgatt ggcgctgcc ttgctcagga cggggctcac
 5 121 gtggtaatct cttegcgtaa acagcaaaat gtagatcgtg ccgttgctgc cctgcaagca
 181 gaaggtctgt ccgtaactgg tactgtgtgc catgtcggga aagccgagga ccgtgaacgt
 241 ctggttcgca cggcccttaa tcttcatggc ggtatcgata tccgttgag taacgcggcc
 10 301 gcaatccgt tttcggtaa gtaaatggac gtcaccgaag aggtgtggga taaaattctg
 361 gacatcaacg tgaagcaat ggcgttgatg accaaagcgg tggttccaga aatggaaaaa
 15 421 cgcggtgggg gctcagttgt cattgtggcc agcattgcag ccttfaatcc atttagcggc
 481 ttaggccgt acaatgtgag taaaacggca ttggtggcc tgaccaagaa cctggcattg
 541 gagttagcag cgcagaacat tcgtgttaac tgtttagcgc cgggectgat taagacatca
 20 601 tcagtaagg cactgtggga ggataaagct caggaggaaa atatcattca gaaactgcgt
 661 attcgccgc tgggaaaacc ggaagaatgt gcaggtatcg ttagctttct gtgctctgaa
 25 721 gatcgcctct atattacggg tgaaacgcta gtggtggcc gcgagcgcc gagccgcctg

SEC ID N° 6: secuencia de ácidos nucleicos carbonil reductasa de *Candida magnoliae* DSMZ 22052

1 atgtctgcta ottcgaacgc tcttataact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca
 30 61 gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg cctcaccgcg tattgagcag
 121 ctcaatgcca tcaaggaaaa actaccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg
 181 cagctcgatc ttagtgcacat cgagggcgct tccaccctca agggggctcc tetgectgcc
 241 agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttcgcagac
 301 caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggttaacc tgctgtgcc tgttcgctt
 35 361 accaagacca ttgttaaggc cctgcgcgac aagcccgcg agacgctgc tcacattatc
 421 ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggg gtcccaacg tggcggctca cagcgcacc
 481 aagggcgca ttgacagctt tgcgcctcgc cttgctcgtg agttcggctc caagaacatc
 541 cagtttaact gcgtgaaccc gggcacgagc cgcaccgaga tgacaaaggg cgttgatctc
 601 gcggttttcg gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tcgatcgcat tgcgcagct
 40 661 gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgtcgtttgt tgacaacgga
 721 ttcggtgttt aa

SEC ID N° 7: secuencia de ácidos nucleicos carbonil reductasa de *Candida vaccinii* CBS7318

1 atgaggtcga cacctaacgc ccttctgact ggcggcagcc gcggcattgg cgcggccgct
 45 61 gcaattaaac tcgccgaggc aggetacagc gtgacgctcg cgtcgcgcyg tctcgacaag
 121 ctcaacgagg tgaaggccaa gcttctcgtc gtgaagcagg gccaggagca ccatgtatgg
 181 cagcttgatc tcagcgagct gcagggccgc ctogagtcca agggcgacc getgcccgcg
 50 241 agtaagtacg atttgtttgt ctgcaacgcc ggcgtggtca ctttctcgc aacggctgag
 301 catgacgaca aggactggca gaacattatt gccgtgaact tgacatgcc cattgccatt
 361 acgaaggcgc tcgttaaggc cgttggcgag cgcctcaacg ataaccggt tcagatcgcg
 421 ttcctgcat cggcgccgc cctgcgcggg gtgcccaga ccgctgttta cagcgcacg
 55 481 aagggcgcc tcgacggctt cagcgcctc ctcgccaaag agctcggccc aaagggcatc
 541 catgtgaaca tcgtacacc tggatggacg cagaccgaga tgactgcggg ttagatgag
 601 cctagggata cccccatccc gggetggatc cagccggaag ccategccga ggccattgtg
 60 661 tatctcgcga agtcaagaa catcacggga acgaacatc ttgtcgaca cggcctgact
 721 atttaa

SEC ID N° 8: secuencia de ácidos nucleicos carbonil reductasa de *Candida magnoliae* CBS6396

65

ES 2 536 488 T3

1 atgaacgctc tagtgaccgg tggtagccgt ggcattggcg aggcgatcgc gaccaagctg
61 gccgaagatg gctacagcgt gacaatcgcc tcgcgcggaa tcgatcagct caacaaggta
121 aaggctaaac ttccggttgt gagggagggc cagaaccacc acgtgtggca gettgatttg
5 181 agcgacgccc aggcgcgctc gtccttcaag ggcgctcctt tgccagcaag cagctacgat
241 gtccttgtea acaacgcccg agtaacggat ccgagtccc a ttgcgaagca gtcggatagc
301 gagattcaca agctgtttag cgtgaatctg ctgtcaccag ttgctttgac aaagacgtac
10 361 gtccaggcgg ttaccggaaa gcctcgtgag acgecagctc acattatatt tatecgtca
421 ggcgttgcca ttccaggcta cccaaacgtc gctgtatact cggctactaa gacggggctc
481 gacggtttca tgaggctctt ggcgcgcgag cttggccccg agggcgtcca tgtgaacact
541 gtcagcccgg gtctcaccaa aaccgagatg gccagcggcg tcagcctcga cgacttcccg
15 601 ccategccga ttgggggctg gatccagccc gaggccatcg ctgatgcagt gaggtacctg
661 gtgaagtcga agaacatcac aggcacgatt ctgtcagttg acaacggaat cacggittaa

20

25

30

35

40

45

50

55

60

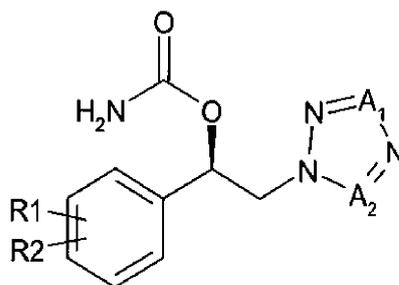
65

Reivindicaciones

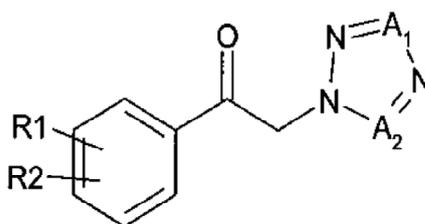
1. Un método para preparar éster aril-2-tetrazolil-etílico del ácido carbámico de la Fórmula química 1, que comprende:

someter una arilcetona, representada por la Fórmula química 2, a reducción enzimática enantioselectiva para formar un compuesto de alcohol de configuración (R), representado por la Fórmula química 3; y carbamatar dicho alcohol

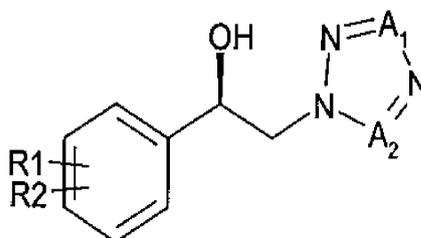
[Fórmula Química 1]



[Fórmula Química 2]



[Fórmula Química 3]



en las que

R_1 y R_2 están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, un alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, un tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y un alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono;

uno de A_1 y A_2 es CH, siendo el otro N; y

dicha reducción enzimática enantioselectiva se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende dicho compuesto de Fórmula química 2, una oxidorreductasa que tiene al menos el 90 % de homología con la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4, NADH o NADPH como cofactor que se oxida durante el proceso de reducción y se regenera continuamente, un co-sustrato que comprende un alcohol secundario representado por la fórmula R_xR_yCHOH en la que R_x representa carbono siendo x un número entero de 1-10 y R_y representa hidrógeno siendo y un número entero igual a dos veces el valor de x más dos, y un tampón adecuado.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la oxidorreductasa está codificada, respectivamente, por la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 8.

3. El método según la reivindicación 2, en el que la oxidorreductasa puede aislarse de *Candida magnolia*, *Candida vaccinii* u *Oryctolagus cuniculus*.

4. El método según la reivindicación 1, en el que la oxidorreductasa está presente en la mezcla de reacción en un

estado completamente purificado, un estado parcialmente purificado, o en las células microbianas que la expresaron.

5. El método según la reivindicación 4, en el que la oxidorreductasa está presente en las células microbianas que la expresaron, células que están en un estado nativo, permeabilizado o lisado.

6. El método según la reivindicación 5, en el que las células microbianas son células de *Escherichia coli* transformadas.

7. El método según la reivindicación 1, en el que la regeneración del cofactor oxidado resulta de la oxidación de dicho co-sustrato.

8. El método según la reivindicación 1, en el que dicho co-sustrato es un alcohol secundario seleccionado del grupo que consiste en 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol y 2-octanol.

9. El método según la reivindicación 1, en el que dicha oxidorreductasa afecta tanto la reducción de la arilcetona de Fórmula química 2 como la oxidación del co-sustrato

10. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de carbamatación se lleva a cabo haciendo reaccionar el compuesto de alcohol de configuración (R) de Fórmula química 3 con cianato inorgánico y un ácido orgánico.

11. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de carbamatación se lleva a cabo hidrolizando un producto resultante de la reacción entre el compuesto de alcohol de configuración (R) de Fórmula química 3 y un compuesto de isocianato seleccionado del grupo que consiste en isocianato clorosulfónico, isocianato de tricloroacetilo e isocianato de trimetilsililo.

12. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de carbamatación se lleva a cabo introduciendo amoniaco en un producto resultante de la reacción entre el compuesto de alcohol de configuración (R) de Fórmula química 3 y un compuesto de carbonilo que comprende 1,1'-carbodiimidazol, haluro de carbamoilo, carbonato de disuccinilo, fosgeno, trifosgeno o cloroformiato.

13. El método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de cristalización después de al menos una de etapa de reducción enzimática enantioselectiva y la etapa de carbamatación.

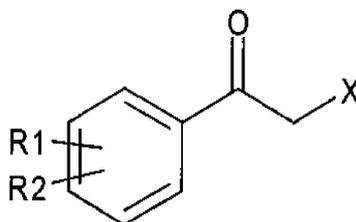
14. El método según la reivindicación 13, en el que la etapa de cristalización comprende:

añadir a un producto de reacción un agente solubilizante seleccionado de entre acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, 1,4-dioxano, un alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono y una mezcla de los mismos; y

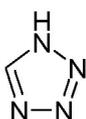
añadir un agente precipitante al mismo seleccionado del grupo que consiste en agua, un alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono, éter dietílico, pentano, hexano, ciclohexano, heptano y una mezcla de los mismos.

15. El método según la reivindicación 1, que incluye adicionalmente la etapa de preparación de la arilcetona de Fórmula química 2 se prepara por reacción de sustitución entre una arilcetona de la siguiente Fórmula química 4 con un tetrazol de la siguiente Fórmula química 5:

[Fórmula Química 4]



[Fórmula Química 5]



en las que

R₁ y R₂ son como se definen en la reivindicación 1; y
X es un grupo saliente seleccionado de entre un haluro y un sulfonato.

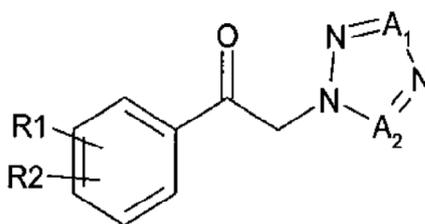
16. El método según la reivindicación 15, que comprende además una etapa de cristalización que comprende:

añadir un agente solubilizante seleccionado de entre acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, 1,4-dioxano, un alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono y una mezcla de los mismos a un producto obtenido por la reacción de sustitución; y

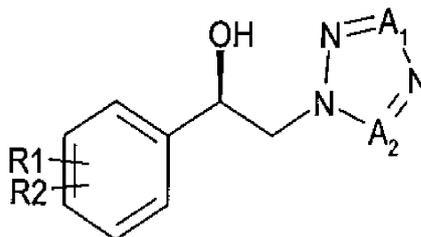
añadir un agente precipitante seleccionado de agua, un alcohol inferior de 1 a 4 átomos de carbono, éter dietílico, pentano, hexano, ciclohexano, heptanos y una mezcla de los mismos.

17. Un método para preparar un compuesto de alcohol, representado por la siguiente Fórmula química 3, mediante la reducción enzimática enantioselectiva de una arilcetona, representada por la siguiente Fórmula química 2:

[Fórmula Química 2]



[Fórmula Química 3]



en las que

R₁ y R₂ están seleccionados independientemente de un grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, perfluoroalquilo, un alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, un tioalcoxi de 1 a 8 átomos de carbono y un alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono;

uno de A₁ y A₂ es CH, siendo el otro N; y

dicha reducción se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende dicho compuesto de Fórmula química 2, una oxidoreductasa que tiene al menos el 90 % de homología con las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4, NADH o NADPH como cofactor que se oxida durante el proceso de reducción y se regenera continuamente, un co-sustrato que comprende un alcohol secundario representado por la fórmula R_xR_yCHOH en la que R_x representa carbono siendo x un número entero de 1-10 y R_y representa hidrógeno siendo y un número entero igual a dos veces el valor de x más dos, y un tampón adecuado.

18. El método según la reivindicación 17, en el que la oxidoreductasa está codificada, respectivamente, por la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 8.

19. El método según la reivindicación 17, en el que la oxidoreductasa puede aislarse de *Candida magnolia*, *Candida vaccinii* u *Oryctolagus cuniculus*.