

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 645**

51 Int. Cl.:

C12P 13/02 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2007** **E 10002779 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017** **EP 2202317**

54 Título: **Proceso para la preparación de aminopirrolidinas quirales ópticamente activas (3-AP, B3-AP)**

30 Prioridad:

13.02.2006 EP 06002859

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

**LONZA AG (100.0%)
LONZASTRASSE
3930 VISP, CH**

72 Inventor/es:

**ROBINS, KAREN;
BORNSCHEUER, UWE y
HÖHNE, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 626 645 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 aminopirrolidinas quirales ópticamente activas (3-AP, B3-AP)

La presente invención hace referencia a un proceso para la preparación de las aminas quirales ópticamente activas 3-aminopirrolidina (3-AP) y N-1-boc-3-aminopirrolidina (B3-AP).

5 Las aminas quirales desempeñan un importante papel en la industria farmacéutica, agroquímica y química. Se utilizan frecuentemente como productos intermedios o sintones para la preparación de diversas sustancias fisiológicamente, por ejemplo farmacéuticamente, activas, tales como derivados de cefalosporina o pirrolidina. Entre la gran cantidad de diversas aplicaciones para las aminas quirales, únicamente una forma ópticamente activa en particular, el enantiómero (R) o (S), presenta la actividad fisiológica deseada. Por tanto, existe una necesidad clara de proporcionar procesos para la preparación de aminas quirales en una forma ópticamente activa.

10 Estas necesidades se cumplen parcialmente con la preparación de aminas quirales mediante cristalización de sales diastereoméricas a través de la adición de ácidos carboxílicos quirales (Breuer et al, *Angewandte Chemie* (2004) 116, 806-843). Otros métodos químicos utilizan síntesis enantioselectiva mediante la reducción de precursores proquirales con dobles enlaces C=N.

15 Además, se conoce la escisión de racematos de forma estereoselectiva que utiliza diversas enzimas, tales como proteasas, amidasas o lipasas (Bornscheuer and Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis* (2005), Wiley-VCH Weinheim). También se conoce que las transaminasas específicas, concretamente las α -transaminasas, que incluyen aminotransferasas de α -aminoácidos, son adecuadas para la preparación de aminoácidos ópticamente puros (Bartsch et al, *Appl. Environm. Microbiol.* (1996) 62, 3794-3799, Cho et al, *Biotechnol. Bioeng.* (2003) 83, 226-234, JP 011 53084 A2 (1998), JP 633 04986 A2 (1988), EP 0 248 357 A2 y Ziehr et al, *Biotechnol. Bioeng.* (1987) 29, 482-487).

20 Sin embargo, estos procesos de la técnica anterior presentan diversas desventajas. Aunque los procesos enzimáticos emplean habitualmente, en contraste con los métodos clásicos, condiciones suaves favorables y logran una estereoselectividad razonable, habitualmente utilizan enzimas cuya especificidad de sustrato, enantioselectividad y/o velocidades de conversión no son lo suficientemente altas para procesos de aplicación industrial. Además, una de las desventajas más prominentes de utilizar transaminasas para la preparación de aminas ópticamente activas está representada por los fenómenos de inhibición del sustrato o del producto observados frecuentemente. Es por lo tanto uno de los objetos de la presente invención proporcionar un proceso mejorado para la preparación de aminas quirales ópticamente activas, en particular un proceso con especificidad del sustrato mejorada, enantioselectividad mejorada y en concreto que permita una conversión de los eductos de hasta el 100%.

25 Shin et al. (*Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 65, páginas 206 a 211) describe la síntesis asimétrica de aminas quirales con omega-transaminasa.

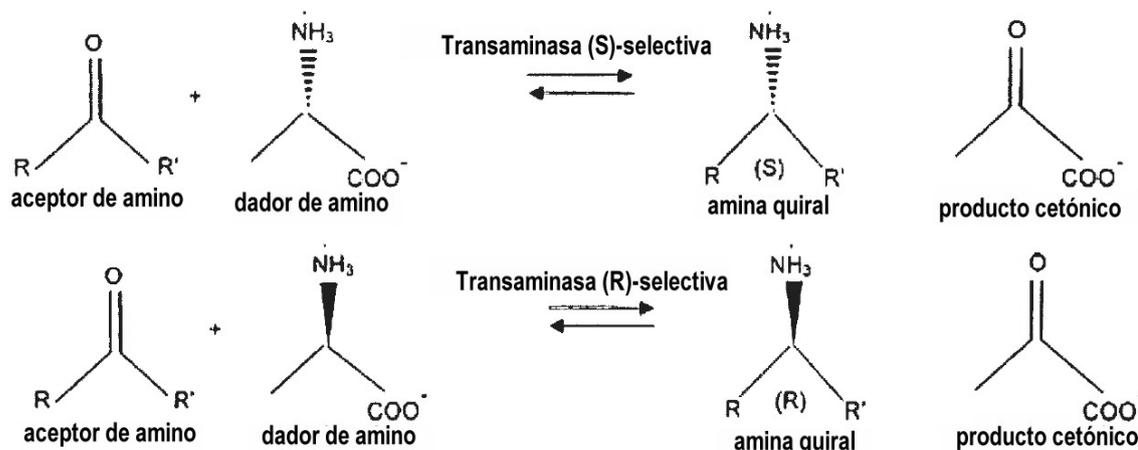
30 El documento WO 2006/126498 (Kaneka Corporation, Noviembre 2006) y la correspondiente memoria EP 1 889 907 A 1 describen métodos enzimáticos para producir compuestos ópticamente activos, entre los que se incluyen 3-aminopirrolidina y N-1-Boc-3-pirrolidina.

35 La presente invención resuelve el problema técnico subyacente en la presente invención proporcionando un proceso para la preparación de una amina quiral ópticamente activa, concretamente 3-aminopirrolidina (3-AP) o una N-1-boc-3-aminopirrolidina (B3-AP) quiral ópticamente activa, que comprende a) proporcionar 3-oxopirrolidina (3-OP) o N-1-boc-3-oxopirrolidina (B3-OP) como aceptor de amino un dador de amino, b) hacer reaccionar el aceptor de amino y el dador de amino con una transaminasa, en particular una transaminasa (R)- o (S)-selectiva, c) obtener la amina quiral ópticamente activa deseada, concretamente 3-AP o la B3AP quiral ópticamente activa, y un subproducto α -cetónico, y d) separar de la mezcla de reacción el subproducto cetónico obtenido en la etapa c) mediante reacción con al menos una enzima.

40

45

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



Por tanto, la presente invención proporciona un proceso para la síntesis asimétrica de aminas quirales según se define en la reivindicación 1, utilizando al menos una transaminasa para la transaminación de un grupo dador de amino a un aceptor de amino, formando de ese modo el producto deseado. Dependiendo de la enantioselectividad de la transaminasa específica utilizada, se obtiene una amina quiral ópticamente activa de la configuración óptica deseada, es decir, el enantiómero (R) o bien el (S). Por tanto, la utilización en una realización de la presente invención de una transaminasa (S)-selectiva para la síntesis asimétrica genera el enantiómero (S) deseado de la amina quiral, mientras que la utilización en otra realización de la presente invención de una transaminasa (R)-selectiva genera el enantiómero (R) deseado. Además de la amina ópticamente activa deseada, la reacción da como resultado un subproducto cetónico, en particular un subproducto α-cetónico, a partir del dador de amino y del aceptor de amino posiblemente no-convertido utilizado, concretamente 3-OP y B3-OP, y un dador de amino.

En el contexto de la presente invención, una transaminasa es una enzima dependiente del piridoxal fosfato que cataliza la transferencia de los grupos amino. Las transaminasas se clasifican según la codificación E.C. 2.6.1.X. En la presente invención, la transaminasa es una transaminasa (R) o (S) selectiva, en particular es, en una realización preferida, una ω-transaminasa.

En el contexto de la presente invención una ω-transaminasa es una enzima preferiblemente con el código de clasificación E.C.2.6.1.18. Estas amino-transaminasas se caracterizan por que principalmente utilizan aminas como sustratos. Estas enzimas se caracterizan además por mostrar una constante de equilibrio de reacciones catalizadas por ω-transaminasa que es mayor que 1. Las ω-transaminasas que pueden utilizarse según la presente invención se describen, por ejemplo, en Iwasaki et al., *Biotechnol. Lett.* (2003) 25, 1843-1846, Shin et al, *Biotechnol. Bioeng.* (1997) 55, 348-358, Shin and Kim, *Book of Abstracts, 21th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., March 21-25, (1999)* 180, Shin and Kim, *Biosc. Biotechnol. Biochem.* (2001) 65, 1782-1788 y Shin and Kim, *Biotechnol. Bioeng.* (1998) 60, 534-540.

Por tanto, en una realización preferida del presente proceso, la transaminasa, es una ω-transaminasa obtenida del *Vibrio fluvialis*, en particular de la cepa JS 17. En una realización preferida, la transaminasa procede de *Alcaligenes denitrificans*, en particular de la cepa Y2k-2. En una realización preferida adicional, la transaminasa procede de *Klebsiella pneumoniae*, en particular de la cepa YS2F. En una realización preferida adicional la transaminasa procede de *Bacillus thuringiensis*, en particular de la cepa JS64. Para las denominaciones de las cepas ver Shin and Kim, 1998, mencionado anteriormente. Por supuesto, la presente invención también entiende bajo el término transaminasa, en particular la ω-transaminasa, un extracto de un organismo, tal como un microorganismo o una célula, que contiene una transaminasa, en particular una ω-transaminasa, o una célula o microorganismo propiamente dicho vivo o muerto que comprende una transaminasa, en particular una ω-transaminasa. Tal microorganismo o célula o extracto o enzima transaminasa puede ser utilizado en su forma inmovilizada o no inmovilizada. La transaminasa, en particular la ω-transaminasa, puede además ser una transaminasa de origen natural o genéticamente modificada producida de forma recombinante, en particular una ω-transaminasa, que es codificada parcial o completamente por una secuencia de ácido nucleico o un derivado del mismo en uno de los organismos identificados anteriormente o que es equivalente a los mismos.

En el contexto de la presente invención el término amina quiral ópticamente activa hace referencia al mismo objeto que el término amina quiral enantioméricamente activa. Estos términos en particular hacen referencia a una preparación que se encuentra esencialmente libre, en una realización más preferida libre, del enantiómero no deseado. Por consiguiente, una amina quiral ópticamente activa comprende esencialmente un exceso de un enantiómero, o incluso consiste en únicamente un enantiómero.

En particular, en el contexto de la presente invención, una amina quiral ópticamente activa presenta una pureza óptica de al menos 70%, en particular mayor que 90% y en el mejor de los casos >99%.

5 En la presente invención la pureza óptica se expresa en % del exceso de un enantiómero sobre el otro enantiómero. Por tanto, la pureza óptica en % es el cociente entre la diferencia de las concentraciones del enantiómero (R) y el (S), y la suma de las concentraciones de ambos enantiómeros (pureza óptica de A en % = $([A]-[B]): ([A]+[B]) \times 100$, en donde A y B representan las concentraciones de los enantiómeros (R) y (S) o vice versa).

10 En la presente invención se prefiere que el aceptor de amino se convierta en la amina quiral deseada en una conversión de al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, en particular 100%. Las concentraciones para analizar la pureza óptica y la conversión pueden ser determinadas, por ejemplo, utilizando cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) o métodos foto- o fluorimétricos.

En el contexto de la presente invención, un aceptor de amino es una molécula capaz de aceptar un grupo amino transferido desde un dador de amino por una transaminasa, en particular una ω -transaminasa. Según la presente invención, el aceptor de amino contiene una funcionalidad cetona y es 3-oxopirrolidina (3-OP) o N-1-boc-3-oxopirrolidina (B3OP).

15 En el contexto de la presente invención, un dador de amino es una molécula capaz de proporcionar un grupo amino a un aceptor de amino utilizando una transaminasa, en particular una ω -transaminasa. En una realización preferida, el dador de amino es una amina o un aminoácido.

20 En una realización particularmente preferida, el dador de amino se selecciona del grupo que consiste en β -alanina, alanina, en particular D,L-alanina, L-alanina o D-alanina, α -metilbencilamina (α -MBA), glutamato, fenilalanina, glicina, 3-aminobutirato, isopropilamina, 2-aminobutano, γ -aminobutirato y una sal, por ejemplo un cloruro, de cualquiera de los mismos. En una realización particularmente preferida, el producto cetónico obtenido puede ser ácido fenilpirúvico, una sal del mismo, ácido pirúvico, una sal del mismo, ácido glioxílico, una sal del mismo, acetofenona, 2-cetoglutarato, acetona, 3-oxobutirato, 2-butanona, 3-oxopirrolidina (3-OP), 3-piridilmetilcetona (3-PMK), éster etílico del ácido 3-oxobutírico (3-OBEE), éster metílico del ácido 3-oxopentanoico (3-OPME), N-1-boc-3-oxopiperidinona y N-1-boc-3-oxopirrolidina (B3OP) o una sal, por ejemplo un cloruro, de cualquiera de los mismos.

25 En una realización particularmente preferida, el dador de amino es alanina, en particular L-alanina.

30 Mediante el proceso descrito pueden prepararse aminas quirales ópticamente activas adicionales que se seleccionan del grupo de aminas que tienen un grupo amino ópticamente activo, en particular aminas con grupos alquilo, grupos alquilo ramificados o grupos arilalquilo. En particular, estas aminas, en concreto aminas mono- o bicíclicas, son en particular aminas aromáticas o de hidrocarburos heterocíclicos sustituidos con S, O, o N o cíclicos de 5 a 6 miembros, en particular aminas aromáticas sustituidas con alquilo o alcoxi. Las aminas quirales obtenidas se seleccionan del grupo que consiste en fenilalanina, alanina, 3-aminopiperidina, alquil-3-amino-butanoatos, 3-aminopirrolidina (3-AP), 3-piridil-1-etilamina (3-PEA), N-1-boc-3-aminopirrolidina (B3AP), éster etílico del ácido 3-aminobutírico (3-ABEE), éster metílico del ácido 3-aminopentanoico (3-APME), α -metilbencilamina (α -MBA), 1-aminotetralina, α -metil-4-(3-piridil)-butanamina, glutamato, β -aminobutirato, sec-butilamina, metoxiisopropilamina, derivados de 3-aminopirrolidina, 1-N-Boc-3-aminopiperidina, cefalosporina y derivados de cefalosporina.

35 La 3-PMK puede hacerse reaccionar con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva y un dador de amino para obtener una (R) o (S) 3-PEA ópticamente activa. El 3-OBEE puede hacerse reaccionar con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva y un dador de amino para obtener un (R) o (S) 3-ABEE ópticamente activo. El 3-OPME puede hacerse reaccionar con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva y un dador de amino para obtener un (R) o (S) 3-APME ópticamente activo.

40 La presente invención también prevé hacer reaccionar la 3OP con una transaminasa (R) o (S)-selectiva y un dador de amino para obtener (R) o (S)-3AP ópticamente activa. La presente invención también prevé hacer reaccionar la B3OP con una transaminasa (R) o (S)-selectiva y un dador de amino, en particular alanina, para obtener (R) o (S)-B3AP ópticamente activa.

45 En una realización particularmente preferida, la invención hace referencia a una reacción entre B3OP y un dador de amino, en particular alanina, en presencia de una transaminasa para obtener B3AP ópticamente activa y piruvato, en donde la reacción se lleva a cabo a un pH de 5,0 a 9,5, preferiblemente 6,0 a 7,0, en particular 6,0 a 6,9, durante un tiempo de 30 a 70 minutos, en particular 40 a 65 minutos, en particular 50 a 60 minutos.

50 En una realización particularmente preferida dicha transaminasa es una transaminasa (R)-selectiva. En una realización preferida adicional, dicha transaminasa es una transaminasa (S)-selectiva.

55 En una realización preferida, dicha reacción de B3OP con el dador de amino, en particular alanina, se realiza en presencia de al menos una piruvato descarboxilasa (PDC). En una realización preferida adicional dicha reacción de B3OP con el dador de amino, en particular alanina, en presencia de al menos una piruvato descarboxilasa, se lleva a cabo mientras se introduce simultáneamente nitrógeno gaseoso en la mezcla de reacción para la separación del acetaldehído obtenido a partir del piruvato formado por la acción de la PDC.

En una realización preferida adicional, dicha reacción de B3OP con el dador de amino, en particular alanina, en presencia de al menos una piruvato descarboxilasa, se lleva a cabo en presencia de al menos una alcohol deshidrogenasa (ADH) para la separación del acetaldehído obtenido a partir del piruvato formado por la acción de la PDC.

- 5 En una realización preferida adicional, dicha reacción de B3OP con el dador de amino, en particular alanina, en presencia de al menos una piruvato descarboxilasa, se lleva a cabo mientras se introduce simultáneamente nitrógeno gaseoso en la mezcla de reacción, en donde se encuentra presente al menos una alcohol deshidrogenasa en el medio de reacción para separar el acetaldehído obtenido a partir del piruvato formado por la acción de la PDC.

- 10 Tal como se describe adicionalmente, un aceptor de amino, en particular compuestos aromáticos o hidrocarburos heterocíclicos sustituidos con S, O o N o cíclicos de 5 a 6 miembros que contienen un grupo oxo, mono- o bicíclicos, en particular compuestos aromáticos sustituidos con alquilo o alcoxi pueden hacerse reaccionar con un dador de amino y una transaminasa (R) o (S) selectiva para obtener aminas ópticamente activas, en particular aminas mono- o bicíclicas, en particular aminas de hidrocarburos heterocíclicos sustituidos con S, O o N o cíclicos de 5 a 6 miembros o aminas aromáticas, en particular aminas sustituidas con alquilo o alcoxi, en particular en su forma (S) o (R).

- 15 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el aceptor de amino según se define en la reivindicación 1, y el dador de amino 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 realiza a un pH en el intervalo de 5,0 a 9,5 o 5,0 a 9,0, en particular de 7 a 8,5. La invención prevé en una realización particularmente preferida, hacer reaccionar el aceptor de amino y el dador de amino a un valor de pH de 6,0 a 7,0, preferiblemente de 6,0 a 6,9.

- 20 En una realización preferida en particular, la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de 10 a 65°C, preferiblemente 20 a 50°C, en particular 18 a 25°C, preferiblemente temperatura ambiente o 34°C a 39°C, en particular 37 °C. En una realización preferida adicional de la presente invención el aceptor de amino y el dador de amino se proporcionan en una relación molar de 1:50 a 1:200, en particular de 1:50 a 1:100, en particular 1:100, en particular de 1:1 a 1:5, en particular de 1:1 a 1:2. En una realización preferida de la presente invención, la actividad enzimática puede ser de 1 a 20.000 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

En una realización preferida adicional la reacción se lleva a cabo durante un tiempo de reacción de 30 a 70, preferiblemente 40 a 65, en particular 50 a 60 minutos.

- 30 En una realización particularmente preferida, la presente invención hace referencia a un proceso para la preparación de una amina quirral ópticamente activa según lo anterior, es decir según lo cual en una primera etapa del proceso, etapa a), se proporciona un aceptor de amino, según se define en la reivindicación 1, y un dador de amino; en una segunda etapa del proceso, etapa b), el aceptor de amino y el dador de amino se hacen reaccionar con al menos una ω -transaminasa; en una tercera etapa del proceso, etapa c), se obtiene una amina quirral ópticamente pura, concretamente 3-AP o B3AP, y un subproducto α -cetónico; y en donde en una etapa adicional del proceso, etapa d), el subproducto cetónico, en particular el subproducto α -cetónico, obtenido en la etapa c), se separa de la mezcla de reacción obtenida por reacción con una enzima, es decir mediante escisión enzimática, en particular utilizando una enzima seleccionada del grupo que consiste en una descarboxilasa, una sintasa o una deshidrogenasa.

- 40 En una realización particularmente preferida, el producto cetónico, en particular piruvato, obtenido en la etapa c), se separa mediante reacción con una piruvato descarboxilasa (PDC), por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* o *Zymobacter palmae*, lo que produce preferiblemente, de ese modo, acetaldehído y CO_2 .

En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico obtenido, en particular piruvato, se separa mediante la acción de una PDC, y en donde el acetaldehído formado de ese modo se separa por ejemplo mediante tratamiento químico, enzimático o físico.

- 45 En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico obtenido, en particular piruvato, se separa mediante la acción de una PDC, y en donde el acetaldehído formado de ese modo se separa por ejemplo alimentando la mezcla de reacción con nitrógeno gaseoso, preferiblemente alimentando la mezcla de reacción con dicho nitrógeno gaseoso de forma continua, para eliminar el acetaldehído de la mezcla de reacción.

- 50 En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico obtenido, en particular piruvato, se separa mediante la acción de una PDC, y en donde el acetaldehído formado de ese modo se separa haciendo reaccionar el acetaldehído con al menos una alcohol deshidroxigenasa (ADH) para separar el acetaldehído de la mezcla de reacción y convertirlo en etanol.

- 55 En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico obtenido, en particular piruvato, se separa mediante la acción de una PDC, y en donde el acetaldehído formado de ese modo se separa aplicando presión reducida a la mezcla de reacción.

En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico obtenido, en particular piruvato,

se separa mediante la acción de una PDC, y en donde el acetaldehído formado de ese modo se separa mediante reacciones químicas.

5 En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico obtenido, en particular piruvato, se separa mediante la acción de una PDC, y en donde el acetaldehído formado de ese modo se separa alimentando la mezcla de reacción con nitrógeno gaseoso, preferiblemente alimentando la mezcla de reacción con dicho nitrógeno gaseoso de forma continua, y en donde adicionalmente el acetaldehído se hace reaccionar con al menos una alcohol deshidrogenasa (ADH) para separar el acetaldehído de la mezcla de reacción y convertirlo en etanol.

10 En una realización preferida adicional del proceso reivindicado, el producto cetónico, en particular piruvato, obtenido en la etapa c) se separa por reacción con una lactato deshidrogenasa (LDH), por ejemplo procedente de *Escherichia coli*, produciendo de ese modo L-lactato.

En una realización preferida adicional del proceso reivindicado el producto cetónico, en particular piruvato, obtenido en la etapa c) se separa mediante reacción con una acetolactasa sintasa, produciendo de ese modo, preferiblemente, acetolactato.

15 En una realización preferida adicional del proceso reivindicado el producto cetónico, en particular piruvato, obtenido en la etapa c) se separa de forma continua de la mezcla de reacción, mediante reacción con al menos una enzima.

Estas realizaciones particularmente preferidas proporcionan la ventaja de obtener una velocidad de conversión particularmente alta, ya que el producto cetónico, como subproducto del presente proceso, se separa de la reacción en equilibrio. Se fuerza la reacción en la dirección de los productos, proporcionando de ese modo una alta estereoselectividad y una alta velocidad conversión en los productos deseados.

20 Pueden obtenerse compuestos fisiológicamente activos o sus precursores y/o productos intermedios en la producción de los mismos, en particular seleccionados del grupo de derivados de 3-aminopirrolidina, cefalosporina, derivados de cefalosporina, ácidos borónicos heterocíclicos, L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa), α -metildopa, D-fenilglicina, β -hidroxifenilglicina, fosfotricina, derivados de pirimido y derivados de pirrolidona, en donde se emplea cualquiera de los procesos identificados anteriormente de la presente invención. Un compuesto fisiológicamente activo es un compuesto que es fisiológicamente activo ya sea en plantas, animales, seres humanos, levaduras o microorganismos, tales como protozoos, bacterias o virus, es decir, interactúa con el metabolismo del organismo.

25

En el proceso de la invención, se obtiene 3-aminopirrolidina o N-1-boc-3-aminopirrolidina.

La presente invención se ilustra en mayor detalle en los siguientes ejemplos y las figuras anexas.

Las figuras anexas ilustran la presente invención.

30 La Figura 1 muestra un cromatograma de capa fina.

La Figura 2 muestra la actividad relativa de ω -TA de *V. fluvialis* en dependencia del valor de pH.

La Figura 3 muestra la reducción relativa de la concentración de B3AP para incubaciones con diversas sustancias.

La Figura 4 muestra la reducción relativa de la conversión de B3AP en presencia de piruvato y acetaldehído.

La Figura 5 muestra la conversión de B3OP a B3AP en función del tiempo para diversas presiones.

35 La Figura 6 muestra la conversión relativa de B3OP a B3AP en presencia de diversas PDC.

La Figura 7 muestra el efecto de un aumento de la concentración de alanina y un aumento de la concentración de PDC sobre una síntesis asimétrica de B3AP.

La Figura 8 muestra la conversión de B3OP a B3AP a concentraciones de alanina aumentadas.

La Figura 9 muestra la conversión relativa dependiente de PLP de B3OP a B3AP.

40 La Figura 10 muestra la conversión relativa de B3OP en B3AP dependiente de la presencia de N₂.

La Figura 11 muestra la conversión relativa de B3OP en B3AP en presencia de una ADH.

Ejemplo 1: Síntesis asimétrica de B3AP

45 Se realizó la síntesis asimétrica de B3AP en tubos de reacción de 1,5 ml. Se utilizó B3OP como aceptor de amino en una concentración de 5 mM (7,5 μ mol). La concentración del dador de amino L-alanina utilizado fue de 5 mM. Los reactivos y las condiciones de reacción utilizadas resultan evidentes a partir de la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: condiciones de reacción para la síntesis asimétrica de (S)-B3AP utilizando (S)- ω transaminasa para realizar la transaminación del grupo amino de alanina a B3OP.

	1		2		3		4		5		6	
B3OP, 20 mM [μ l]	375		375		375		375		375		375	
D,L-Ala, 100 mM [μ l]	150		26 mg D,L-Ala		150		150		150		150	
TA7 / TA8 [μ l]	18	111	18	111	18	111	18	111	18	111	18	111
LDH [μ l]	-		-		-		-		-		500 μ l + 60 μ l 250 mM NADH	
PDC1 [μ l]	-		-		200 (15U)		-		-		-	
PDC2 [μ l]	-		-		-		34 (20U)		34 (20U)		-	
Tampón [μ l]	957	864	1218	1125	664		923	830	923	830	397	304

5 El tampón utilizado fue fosfato sódico 50 mM, pH 7. TA7 designa la ω -transaminasa procedente de *Vibrio fluvialis* (Jülich Fine Chemicals, Alemania). TA8 designa la ω -transaminasa procedente de *Alcali-genes denitrificans* (Jülich Fine Chemicals, Alemania). Como lactato deshidrogenasa se utilizó un extracto de *Escherichia coli*. Además, se añadió NADH a una concentración final de 10 mM. La concentración de piruvato descarboxilasa varió. Se utilizaron 1,5 unidades (20 μ l) y 15 unidades (200 μ l) de piruvato descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (PDC1). Se utilizaron 2 unidades (3,4 μ l) y 20 unidades (34 μ l) de piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* (PDC2).

10 Tabla 2: Conversión y pureza óptica obtenida utilizando TA8 para la síntesis asimétrica de B3AP. Los cálculos se basaron en análisis GC (+/- 5%).

Ciclo	Enzima	Conversión [%]	% ee _s [%] (S)-enantiómero
1	TA7 o TA8 sola	1,3	99,4
2	Exceso de Alanina	10,1	99,6
3	PDC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,6	99,5
4	PDC <i>Zymomonas mobilis</i>	34,0	99,6
5	PDC <i>Zymomonas mobilis</i> (72 horas)	73,0	99,4
6	LDH <i>Escherichia coli</i>	66,5	99,9

15 En referencia ahora a la tabla 2 anterior, es evidente que en cada uno de los seis ciclos que utilizan la ω -transaminasa TA8, pudo lograrse un muy alto grado de pureza óptica para la (S)-B3AP obtenida. También se observó que independientemente de utilizar la TA7 o la TA8, el grado de conversión fue únicamente moderado, si no se influía en el equilibrio de la reacción (ciclo 1). La utilización de alanina en un exceso de 10-50 veces mejoró solo ligeramente la conversión. En los ciclos 3, 4, 5 y 6 el producto cetónico de la reacción, es decir piruvato, fue separado, durante la reacción de transaminación, de la reacción de equilibrio. El uso de TA8 junto con lactato deshidrogenasa procedente de *E. coli* (ciclo 6) condujo hasta un grado extremadamente mejorado de conversión a la vez que se mantenía e incluso mejoraba la enantioselectividad. Esencialmente lo mismo es válido para la enantioselectividad proporcionada por la piruvato descarboxilasa procedente de *Zymomonas mobilis* (ciclos 3 a 5).
 20 La PDC1, sin embargo, aumentó la conversión solo ligeramente, la PDC2 aumentó la velocidad de conversión moderadamente (ciclo 4) cuando se sometió a una reacción de 24 horas, mientras que en una reacción de 72 h (ciclo 5) la conversión fue mejorada drásticamente. Todas las reacciones tuvieron lugar durante 24 horas, excepto para el caso del ciclo 5 que tuvo lugar durante 72 horas.

30 La figura muestra el cromatograma de capa fina de las reacciones realizadas según la tabla 1. "A" designa la ω -transaminasa de *Alcaligenes denitrificans*, mientras que "V" la ω -transaminasa de *Vibrio fluvialis*. "K" designa el ciclo 1 que utiliza TA7 o TA8 en solitario (ciclo 1). PDC1 designa el ciclo con piruvato descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ciclo 3), LDH el ciclo con lactato deshidrogenasa de *Escherichia coli* (ciclo 6) y PDC2 el ciclo con piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* (después de 24 y 72 horas) (ciclo 4 y 5). Por tanto, los resultados muestran claramente que la producción de (S)-B3AP a partir de B3OP cetónico proquiral podría realizarse con una

enantioselectividad muy alta. La utilización de ω -transaminasas como las únicas enzimas en el proceso de preparación, sin embargo, conduce a una conversión moderada. Esta velocidad de conversión moderada podría mejorarse enormemente separando piruvato de la reacción en equilibrio, en particular utilizando lactato deshidrogenasa o piruvato descarboxilasa. La utilización de piruvato descarboxilasa presenta, entre otras, la ventaja de que no es necesario ningún reciclaje del cofactor (NADH). Proporciona además de forma ventajosa la separación enzimática de piruvato con PDC y por tanto proporciona la ventaja adicional de eliminar o evitar la inhibición del producto (producto cetónico) y desplazar el equilibrio de reacción hacia la derecha logrando una conversión más elevada (en el caso ideal el 100%).

Ejemplo 2: dependencia del pH de la actividad de la ω -transaminasa en la reacción de conversión de (S)- α MBA en acetofenona (no es parte de la invención)

La síntesis se realizó en una cubeta de cuarzo utilizando 50 μ l de piruvato 100 mM, 4 unidades/ml de ω -TA de *Vibrio fluvialis* (en lo sucesivo también Vfl) (12 μ l) and 388 μ l de un tampón de fosfato de sodio, 50 mM con variaciones de pH de pH 6,0 a pH 7,4 en 0,2 etapas. La reacción se inició con 50 μ l de (S)- α MBA 100 mM como dador de amino y se midió el aumento de la absorción en el rango de 250 a 260 nm. El aumento de la absorción se debe a la acetofenona formada. Los otros sustratos contribuyen únicamente de forma insignificante a la absorción, de manera que la velocidad de reacción puede ser determinada mediante la medición de la absorción de acetofenona. El valor alcanzado a pH 7,4 se estableció como el 100% y la actividad relativa para los demás valores de pH se calculó como resulta evidente a partir de la figura 2. La Figura 2 muestra la actividad relativa de ω -TA de *V. fluvialis* en dependencia del valor de pH dado.

La Figura 2 muestra que a valores de pH inferiores tales como 6,0, 6,2 o 6,4 existe aún una considerable actividad presente, por ejemplo 11 % a un pH 6,0. Por tanto, este resultado demuestra que incluso a un pH bajo, es posible obtener una actividad transaminasa significativa, lo que permite hacer reaccionar sustratos a un pH inferior, lo que a su vez permite aumentar la conversión utilizando una PDC, la cual es sensible a valores de pH más elevados.

Ejemplo 3: Síntesis asimétrica de B3AP a diferentes valores de pH

En este ejemplo, se muestra la síntesis asimétrica de B3AP a partir de alanina y B3OP en presencia y ausencia de una piruvato descarboxilasa (PDC).

Para cada valor de pH 6,0, 6,4 y 7,0 se realizaron tres ciclos de experimentos. El ciclo 1 utilizó la PDC de *Zymomonas mobilis* (extracto de células de tipo silvestre), el ciclo 2 utilizó el *Zymobacter palmae* (recombinante en *E. coli*) y el ciclo 3 era un control sin PDC, que solo utilizaba la transaminasa. Para obtener resultados comparables, se han determinado las actividades de ambas PDC a un pH 6 con un ensayo de alcohol deshidrogenasa y se utilizó la misma cantidad de actividad de las PDC en los ciclos identificados anteriormente.

La Tabla 3 proporciona los volúmenes de la sustancia utilizada en μ l. Cada ciclo de reacción se realizó tres veces a valores de pH 6,0, 6,4 y 7,0. El valor de pH fue ajustado mediante el tampón de la solución del sustrato B3OP. La actividad de la PDC fue de aproximadamente 2,5 unidades/ml a un pH 7. Las concentraciones del sustrato y la enzima son también evidentes a partir de la tabla 3 siguiente. Después de 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos, se tomó una muestra de 100 μ l y se detuvo la reacción mediante adición de 100 μ l de NaOH 1 M. La cuantificación de la concentración de B3AP se realizó utilizando CE (electroforesis capilar).

Tabla 3

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
B3OP 10 mM en tampón 100 mM de valor de pH correspondiente	500	500	500
D,L-alanina 400 mM	25	25	25
PDC <i>Z. mobilis</i>	290	-	-
PDC <i>Zb. palmae</i>	-	18,32	-
ω -TA <i>V. fluvialis</i> a pH 7,0	21,4	21,4	21,4
ω -TA <i>V. fluvialis</i> a pH 7,4	72,3	72,3	72,3
ω -TA <i>V. fluvialis</i> a pH 6,0	110	110	110
TPP 4 mM	25	25	25
PLP 4 mM	25	25	25
MgCl ₂ 40 mM	25	25	25
Agua	Adición de 1000 μ l		

- 5 La Tabla 4 siguiente muestra la conversión a diferentes valores de pH para las diferentes PDC. Es evidente que el uso de PDC aumenta la conversión. Es también evidente que la PDC de *Z. palmae* (*Zpa*) causa una conversión de alguna manera más elevada que la PDC de *Z. mobilis* (*Zmo*). Es también evidente que a valores de pH inferiores, tales como 6,0 o 6,4, se observa un notable aumento de la conversión en los ciclos que utilizan PDC, que no se observa en el control libre de PDC. En todos los ciclos de reacción pudo observarse que después de 120 minutos la conversión disminuyó.

Tabla 4

Conversión									
	Ciclo 1 (<i>Zmo</i>)			Ciclo 2 (<i>Zpa</i>)			Ciclo 3 (control)		
Tiempo (min)	pH 6	pH 6,4	pH 7	pH 6	pH 6,4	pH 7	pH 6	pH 6,4	pH 7
10	7,5	5,5	2,4	12,1	9,8	4,9	2,5	2,4	2,0
30	11,4	14,2	9,6	16,0	17,8	15,2	5,1	4,8	4,6
60	8,3	n.d.	12,4	11,0	n.d.	16,3	7,0	n.d.	n.d.

n.d. = no determinado

- 10 Ejemplo 4: Estabilidad de B3AP en presencia de diversos reactivos de una reacción de síntesis asimétrica

Para mostrar la estabilidad de B3AP en presencia de diversos reactivos, se realizaron incubaciones de B3AP 1 mM en un tubo de reacción durante 3 horas en presencia de diversas sustancias según se detalla en la tabla 5 siguiente.

- 15 El ejemplo se llevó a cabo a un pH de 6 y 7 (tampón de fosfato de sodio). Directamente después de hacer reaccionar las sustancias, se tomó una primera muestra, T_0 , y otra muestra, T_1 , después de 3 horas. Después de la extracción, se determinó la concentración de amina con un patrón interno (α MBA) por CE. A partir de la diferencia de las concentraciones obtenidas, se calculó el % de disminución de la concentración de B3AP (ver figura 3).

Tabla 5

Ciclo	B3AP 1 mM y: Reactivos
1	Tampón Na-P 50 mM
2	B3OP 5 mM
3	D,L-alanina 10 mM
4	cofactores (PLP, TPP 0,1 mM, Mg 5 mM)
5	cofactores + B3OP + alanina
6	145 μ l de extracto de células de <i>Z.mobilis</i> (50 % glicerina)
7	10 μ l de extracto de células de <i>E. coli</i> (<i>Zpa</i> PDC recombinante)
8	55 μ l / 11 μ l de <i>Vfl</i> -T A (pH6/7)
9	50 μ l de <i>Ade</i> - TA
10	<i>Vfl</i> -TA+B3OP+cofactores
11	acetaldehído 1 mM
12	<i>Vfl</i> -TA + acetaldehído
13	<i>Ade</i> -TA + acetaldehído

A partir de la Figura 3 es evidente que los diferentes reactivos no afectan de forma significativa a la concentración de B3AP (ciclos 1 a 9). Los ciclos de reacción 11 a 13 muestran la influencia del acetaldehído. A partir del ciclo 11 es evidente que en ausencia de una transaminasa no existe reducción en la concentración de B3AP, mientras que en presencia de una transaminasa y acetaldehído puede observarse una fuerte reducción de la concentración de B3AP. El acetaldehído funciona en la reacción de transaminasa como un aceptor de amino, tal como piruvato, y obviamente conduce a una reducción de la concentración de B3AP.

Ejemplo 5: Reacción de B3AP con los aceptores de amino piruvato y acetaldehído

En este ejemplo se muestra la actividad transaminasa de la ω -TA *V. fluvialis* y *A. denitrificans* para los sustratos B3AP y piruvato, y para B3AP y acetaldehído. Se hizo reaccionar B3AP 2 mM con piruvato 2 mM o acetaldehído 2 mM (se hicieron reaccionar 36 μ l de transaminasa de *Alcaligenes denitrificans* (Ade) o 6 μ l de la de *Vibrio fluvialis* (Vff) por 0,5 μ l de volumen de reacción, lo que corresponde a 2 unidades/ μ l de transaminasa, durante 30 minutos). La Figura 4 muestra los resultados. Por consiguiente, se convirtió B3AP en B3OP mediante ambas enzimas, tanto con piruvato como acetaldehído, sin ningunas diferencias significativas.

Ejemplo 6: Síntesis asimétrica de B3AP bajo presión reducida a un pH 6

En este ejemplo, se aplicó presión reducida a la mezcla de reacción para una reacción de síntesis asimétrica para formar B3AP. Como control, se realizó la misma reacción bajo presión normal y sin PDC.

Condiciones de reacción:

Volumen final: 1,5 ml

tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6

300 μ l de *Vibrio fluvialis*- transaminasa

60 μ l de Zpa-PDC (corresponde a 8 unidades/ml a un pH 7)

B3OP 5 mM

D,L-alanina 10 mM

TPP, PLP 0,1 mM

MgCl₂ 5 mM

La presión reducida se aplicó utilizando un evaporador rotatorio (150 mbar). La medición se realizó utilizando CE.

La Figura 5 muestra la conversión de B3OP en B3AP en función del tiempo para diversas presiones. Es evidente que la conversión es casi independiente de la presión aplicada. La conversión a una presión de 150 mbar es, con respecto a la conversión máxima lograda, similar a la conversión a una presión de 1000 mbar.

Ejemplo 7: Comparación de diversas piruvato descarboxilasas

En este ejemplo, se utilizaron tres piruvato descarboxilasas diferentes para la síntesis asimétrica de B3AP. Las condiciones de reacción corresponden a las del ejemplo 6, excepto que se utilizó un pH 7. Se utilizaron unas PDC procedentes de *Z. mobilis*, *Z. palmae* y una PDC de Biocatalytics (catálogo nº PDC-101). Las actividades de las PDC en el ensayo de ADH fueron idénticas (1,6 unidades/ml).

La Figura 6 muestra que todas las tres PDC dan como resultado conversiones comparables.

Ejemplo 8: Influencia de las concentraciones de la enzima y el co-sustrato en la conversión de B3OP a B3AP

En este ejemplo, se muestra la influencia de las concentraciones de PDC en la conversión de B3OP a B3AP que utiliza alanina como dador de amino. Además, se muestra la influencia de la concentración de alanina en la conversión de B3OP a B3AP.

Las condiciones de reacción se proporcionan en el ejemplo 6, excepto que se utiliza un pH 7 y excepto si se indica de otro modo. Se utilizó TA de *Zymobacter palmae*.

Tal como resulta evidente a partir de la figura 7, en una reacción sin PDC un aumento en 5-veces de la concentración de alanina de 5 mM a 25 mM, da como resultado la duplicación de la conversión (una conversión del 12% en contraste con 5,3% después de 2 horas). En presencia de PDC, la conversión aumenta en un exceso de 5 veces la alanina con respecto al duplicado (30% en contraste con 17% tras 90 minutos). En caso de que la cantidad de PDC se vea aumentada a la concentración habitual de alanina de 1,6 unidades/ml a 50 unidades/ml, la conversión también aumenta, sin embargo, únicamente en un factor < 2 (29% en contraste con el 17% tras 40 minutos).

En un ciclo adicional de experimentos, se muestra la influencia de una combinación de exceso de alanina y un exceso de PDC, tanto a un pH 6 y 7. La reacción es más rápida a un pH 6, mientras que después de alcanzar una conversión del 49%, la concentración de B3AP también disminuye más rápidamente. A un pH 7 la conversión aumentó hasta el 56%.

5 Ejemplo 9: Influencia de la concentración de alanina en la síntesis asimétrica de B3AP

En cuatro reacciones, se utilizaron concentraciones de alanina de 5 mM, 25 mM, 110 mM, 300 mM y 500 mM. Para cada ciclo, se realizó un control sin PDC y una reacción con PDC. El valor de pH se ajustó a un pH 7,0. Las muestras se tomaron cada media hora para un tiempo de reacción de 3 horas. Los tiempos de reacción para las conversiones proporcionadas en la figura 8 fueron para 5 mM 40 minutos, para 25 mM 60 minutos y para 110 a 500 mM 90 minutos.

La Figura 8 muestra la conversión de la síntesis asimétrica de B3AP a unas concentraciones de alanina aumentadas.

La Figura 8 muestra claramente que la conversión puede lograr el 60 al 70%. Es evidente que aumentar la concentración de alanina de 25 a 110 mM, tiene un efecto significativo en la conversión de B3OP en B3AP, y que un aumento adicional hasta 500 mM solo ejerce una ligera influencia en la conversión. La influencia de PDC en la conversión disminuye con un aumento de la concentración de alanina.

A partir de los datos de la reacción de control, se calculó la constante de equilibrio de la síntesis de B3AP como sigue a continuación:

$$[B3AP] = [Pir]$$

$$20 \quad [B3OP] = C_{0,B3OP} - [B3AP] \text{ y}$$

$$[Ala] = C_{0,Ala} - [B3AP]$$

Por tanto, utilizando la concentración medida de B3AP, la constante de equilibrio se calculó como:

$$K = \frac{[B3AP] \cdot [Pir]}{[B3OP] \cdot [Ala]} = \frac{[B3AP]^2}{(c_{0,B3OP} - [B3AP]) \cdot (c_{0,Ala} - [B3AP])}$$

$c_0, [Ala]$	$[B3AP]$	$K \cdot 10^{-3}$
5	5	3,2
25	12	3,1
110	24	3,5
300	35	3,2
500	40	2,8
Media de K:		3,1

25 Tabla 6

La Tabla 6 muestra los valores calculados. De ese modo, la constante de equilibrio para la reacción con B3AP es $3,1 \times 10^{-3}$. Por tanto, el sustrato B3OP es adecuado para la síntesis asimétrica en contraste con otras cetonas.

Ejemplo 10: Influencia de PLP en la síntesis asimétrica de B3AP

En este ejemplo, se muestra la influencia de PLP (piridoxal-5'-fosfato) en la conversión de B3OP a B3AP. Los siguientes tres ciclos de reacción han sido examinados.

a) el ciclo 1 que utiliza PLP 0,1 mM sin adición de PLP adicional.

b) En el ciclo 2 se añadió PLP durante la reacción tan pronto como se desvaneció el color amarillo, que es debido a la presencia de PLP en el medio de reacción. Para este fin, se añade de 1 a 2 μ l de una solución de PLP saturada, recuperando de ese modo un fuerte color amarillo. Se considera que la influencia en la concentración de amina a través de este ligero aumento en el volumen está por debajo del 1% y puede, por tanto, descartarse.

c) No hay PLP presente y no se añade PLP.

Condiciones de reacción: un volumen final de 1 ml, 37 μ l de transaminasa de *Vfl*, B3OP 5 mM, tampón de fosfato pH

7,0. La concentración de L-alanina fue de 110 mM. Las mediciones se tomaron mediante CE y se utilizó α -MBA como patrón interno.

La Figura 9 muestra la conversión en el tiempo. Parece no haber una influencia significativa en la conversión máxima debido a la adición de PLP en el ciclo b) en comparación con el ciclo a). La reacción sin PLP parece ser menor, aunque alcanza la misma conversión que las otras reacciones. La adición de PLP en el ciclo b) causa una reducción ligeramente mayor en la concentración de amina en comparación con el ciclo de control.

Ejemplo 11: Síntesis asimétrica de B3AP con separación de acetaldehído mediante adición de nitrógeno

El siguiente ejemplo detalla una forma de mejorar la conversión de la síntesis asimétrica de B3AP mediante la separación de acetaldehído.

10 Condiciones de reacción:

Sustratos:

B3OP 5 mM

L-alanina 500 mM

32 U/mL de *Zpa*-PDC

15 37 μ l/ml de *Vfl*-transaminasa

Tampón de fosfato de sodio pH 7,0

PLP y TPP (tiamina difosfato) 0,1 mM

MgCl₂ 5 mM

20 Debido a que la solución de reacción contenía una cantidad significativa de proteína, hubo una fuerte tendencia a la formación de espuma. Para suprimir dicha formación de espuma, se añadió un concentrado de 0,6 μ l de un anti-espumante A (Sigma, polímero de silicona) al ciclo de reacción. El concentrado suprimió la generación de espuma en gran medida pero no pudo inhibirla completamente. Para evitar que dicho concentrado anti-espumante inhiba las enzimas, se complementó el ciclo de control sin adición de nitrógeno con un anti-espumante A.

25 Debido a que la adición de nitrógeno seco condujo a una evaporación de agua de la solución de reacción, el nitrógeno se humedeció.

La Figura 10 muestra las conversiones relativas de B3AP calculadas. El control con anti-espumante A (N₂-control: *Vfl*-TA, *Zpa*-PDC, anti-espumante, sin nitrógeno N₂) sin adición de nitrógeno corresponde exactamente al ciclo de reacción sin anti-espumante A (*Vfl*-TA, *Zpa*-PDC). Por tanto, las enzimas no se ven influenciadas por la adición del concentrado anti-espumante. El ciclo (ciclo N₂: *Vfl*-TA, *Zpa*-PDC, anti-espumante, N₂) tratado con nitrógeno mostró un aumento de la conversión después de 60, 90 y 180 minutos.

Ejemplo 12: Síntesis asimétrica de B3AP bajo diversas condiciones

Condiciones de reacción:

Volumen Final: 1 ml

37 μ l *Vfl*-transaminasa

35 32 unidades/ml *Zpa*-PDC o Biocatalytics PDC o 3,2 unidades/ml *Zmo* PDC

B3OP 5 mM

L-alanina 500 mM

Cofactores PLP y TPP 0,1 mM, MgCl₂ 5 mM

fosfato de sodio, pH 7

40 La Figura 10 muestra la conversión de B3OP a B3AP para los ciclos de reacción identificados anteriormente que combinan la *Vfl*-transaminasa con cada PDC.

En la figura 10 el ciclo designado N2 es el ciclo que contiene *Vfl*-transaminasa y *Zpa*-PDC tratado con nitrógeno y anti-espumante A. El control N2 es una muestra que contiene *Vfl*-transaminasa, *Zpa*-PDC y anti-espumante A sin tratamiento con nitrógeno. Es evidente que existe un aumento significativo en la conversión del control N2 a la muestra N2 debido a la presencia de nitrógeno, con el que se ha alimentado la solución de reacción. Por tanto,

45

alimentar el medio de reacción con nitrógeno en forma gaseosa aumenta de forma significativa la conversión de B3OP a B3AP.

Ejemplo 13: Síntesis asimétrica de B3AP en presencia de alcohol deshidrogenasa (AOH)

- 5 Para separar el acetaldehído producido por la reacción de PDC de la mezcla de reacción, puede utilizarse AOH para convertir el acetaldehído a etanol.

Condiciones de reacción:

L-alanina 110 mM

B3OP 5 mM

37 µl/ml de *Vfl*-transaminasa

- 10 32 unidades/ml *Zpa* PDC

PLP y TPP 0,1 mM

MgCl₂ 5 mM

Tampón de fosfato de sodio, pH 7

Se muestran los siguientes ciclos:

- 15 Ciclo de reacción 1: reacción con PDC y transaminasa

Ciclo de reacción 2: reacción con PDC y transaminasa con etanol 5 mM (concentración final) y adición de NADH

Ciclo de reacción 3: reacción con PDC, ADH y NADH

El ADH utilizado fue ADH de *Saccharomyces cerevisiae* con una actividad de entre 50 y 100 unidades/ml. La actividad PDC fue de 32 unidades/ml.

- 20 Al principio de la reacción se ha añadido etanol absoluto al ciclo de reacción 2 en una concentración final de 5 mM. Al principio de la reacción se añadieron 5 µmol de NADH a los ciclos de reacción 2 y 3, lo que corresponde a una concentración final 5 mM de NADH. Después de 10 minutos, se añadió una adición más de 2,4 µmol de NADH (4 µl de una solución de NADH 0,6 M en tampón de fosfato 50 mM, pH 8,5). La solución de NADH se preservó en hielo y se preparó inmediatamente antes de su uso.

- 25 Los resultados se proporcionan en la figura 11 y en la tabla 5. El efecto de la ADH es claramente evidente. La conversión aumenta hasta aproximadamente un 90%. El ciclo de control 2 sin ADH y etanol 5 mM sólo se desvía ligeramente del ciclo de control 1. Por tanto, la adición de ADH aumenta enormemente la conversión en la síntesis asimétrica de B3AP a partir de B3OP.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una 3-aminopirrolidina (3-AP) quiral ópticamente activa o una N-1-boc-3-aminopirrolidina (B3-AP) quiral ópticamente activa que comprende:
- 5 a) proporcionar 3-oxopirrolidina (3-OP) o N-1-boc-3-oxopirrolidina (B3OP) como aceptor de amino y un dador de amino,
- b) hacer reaccionar el aceptor de amino y el dador de amino con una transaminasa (R)- o (S)-selectiva,
- c) obtener la 3-AP quiral ópticamente activa deseada o la B3AP quiral ópticamente activa y un subproducto alfa-cetónico y
- 10 d) separar el subproducto cetónico obtenido en la etapa c) de la mezcla de reacción mediante reacción con al menos una enzima.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el dador de amino se selecciona del grupo que consiste en aminas y aminoácidos.
3. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la ω -transaminasa es de *Vibrio fluvialis*, *Alcaligenes denitrificans*, *Klebsiella pneumoniae* o *Bacillus thuringiensis*.
- 15 4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el subproducto cetónico obtenido en la etapa c) es piruvato.
5. El proceso según la reivindicación 1, en donde la enzima es una piruvato descarboxilasa (PDC).
6. El proceso según la reivindicación 1, en donde la enzima es una lactato deshidrogenasa (LDH) o una acetolactato sintasa.
- 20 7. El proceso según la reivindicación 5, en donde el acetaldehído formado por la acción de la PDC se separa.
8. El proceso según la reivindicación 7, en donde el acetaldehído se separa mediante reacción con al menos una enzima.
9. El proceso según la reivindicación 7, en donde el acetaldehído se separa alimentando la mezcla de reacción con nitrógeno gaseoso (N₂) o aplicando una presión reducida a la mezcla de reacción o mediante métodos químicos.
- 25 10. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la amina ópticamente activa obtenida en la etapa c) o d) se separa de la mezcla de reacción obtenida en la etapa c) o d).
11. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso se realiza en una mezcla de reacción que tiene un pH de 5,0 a 9,5.
- 30 12. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso se realiza durante un tiempo de reacción de 40 a 70 minutos.
13. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dador de amino es alanina.
14. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9 y 13, en donde el acetaldehído formado por la reacción de la PDC se separa alimentando la mezcla de reacción con nitrógeno gaseoso (N₂).
- 35 15. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5, 7 y 13, en donde la reacción se realiza en presencia de al menos una piruvato descarboxilasa y al menos una alcohol deshidrogenasa y opcionalmente en presencia de nitrógeno gaseoso (N₂).

Figura 1

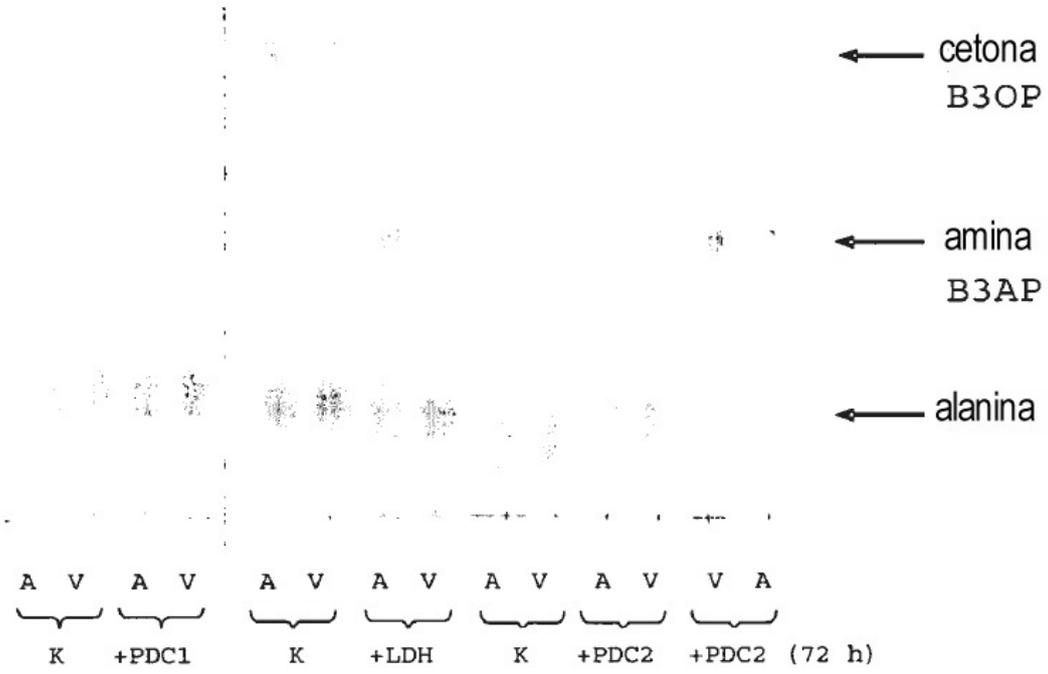


Figura 2

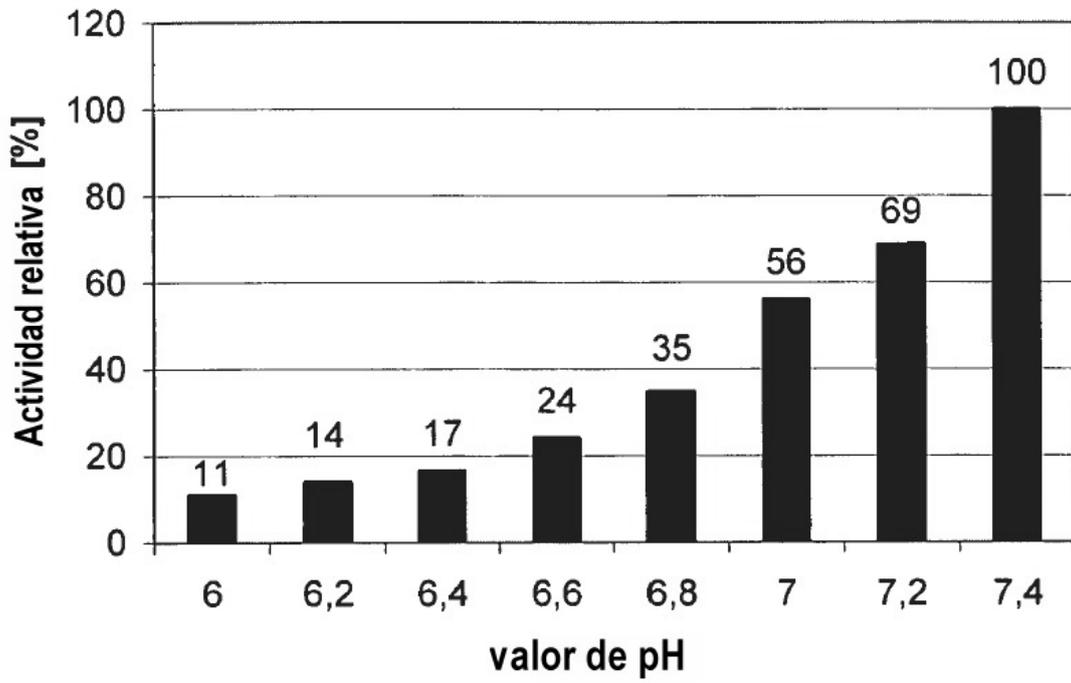


Figura 3

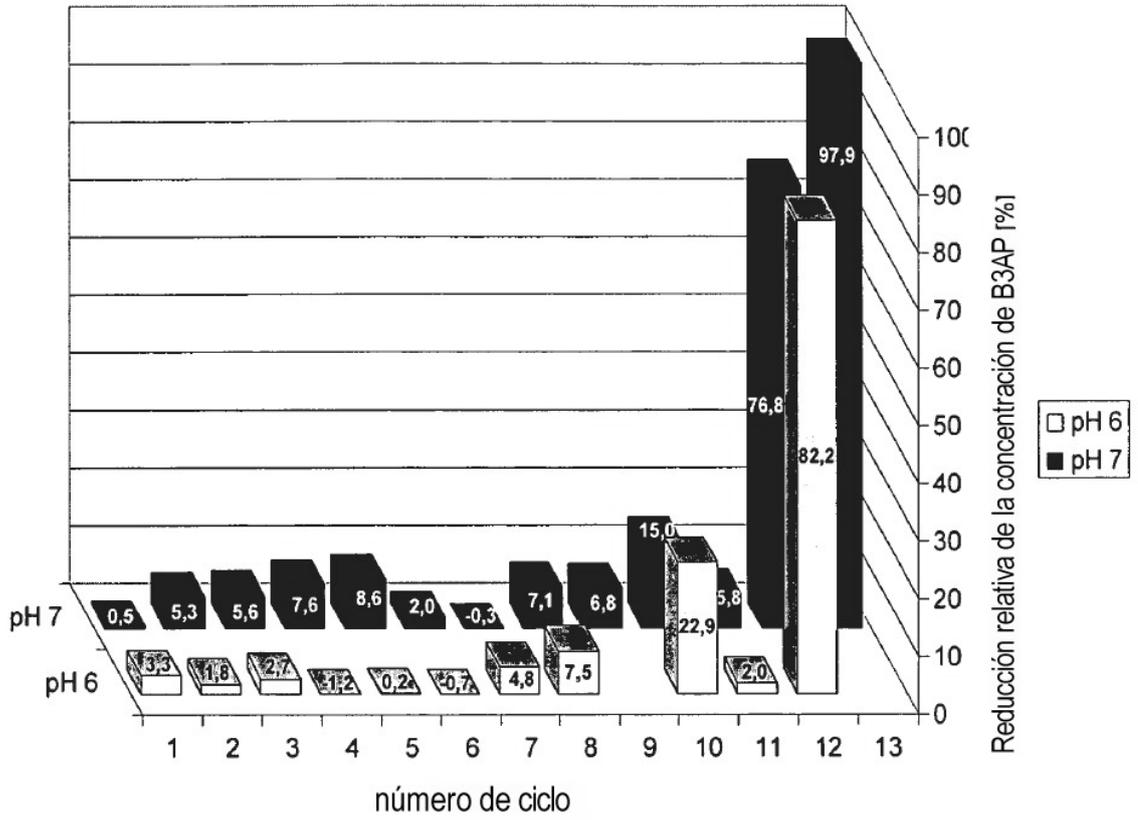


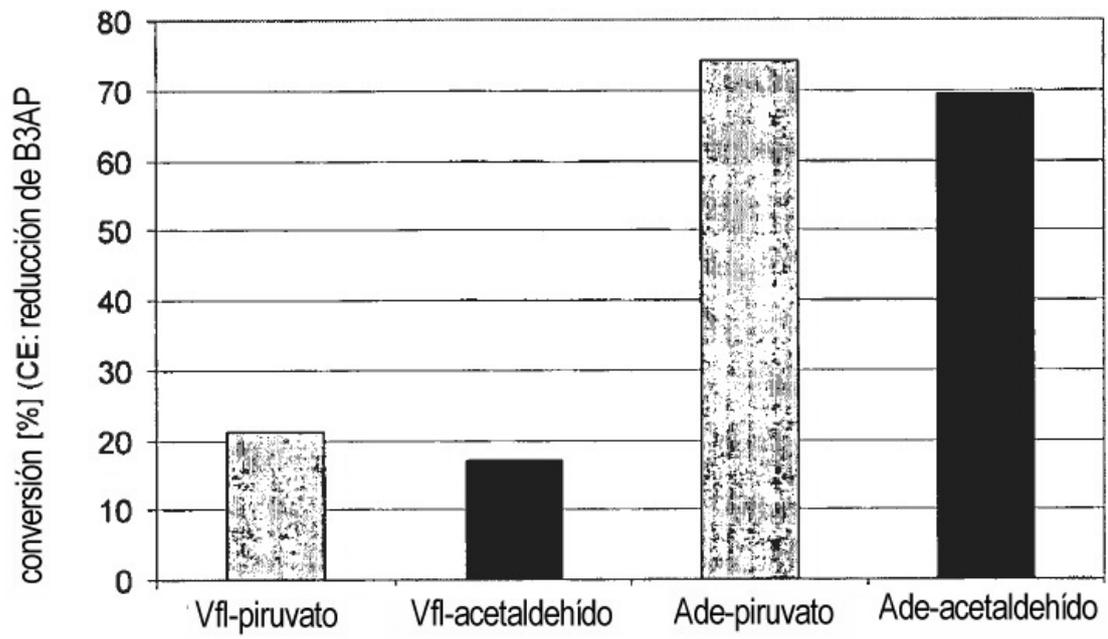
Figura 4

Figura 5

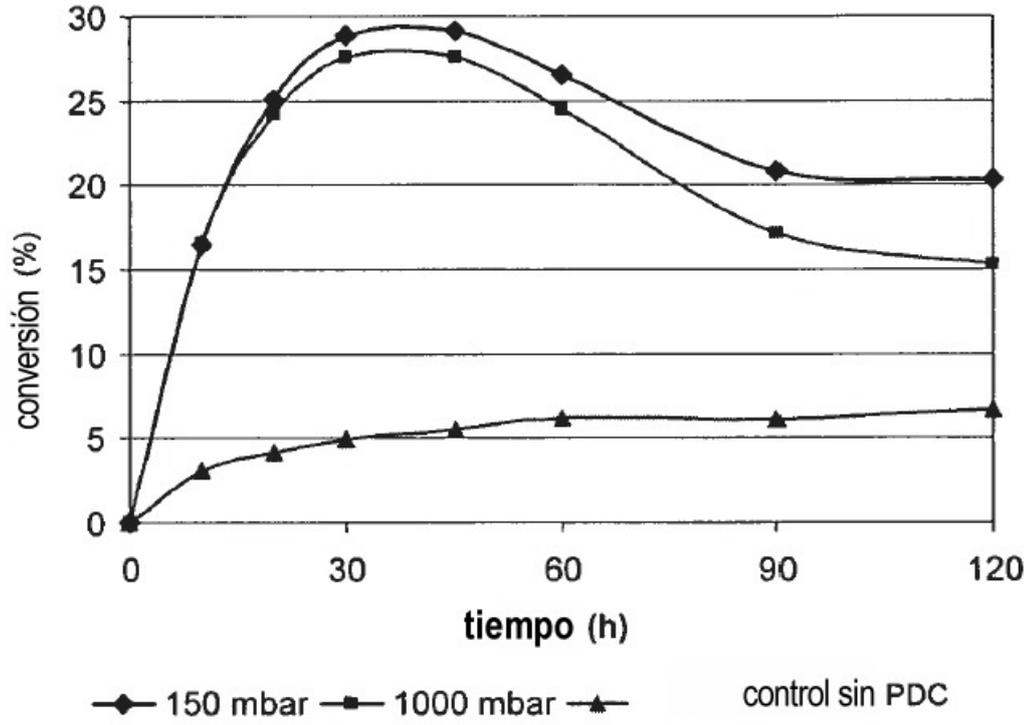


Figura 6

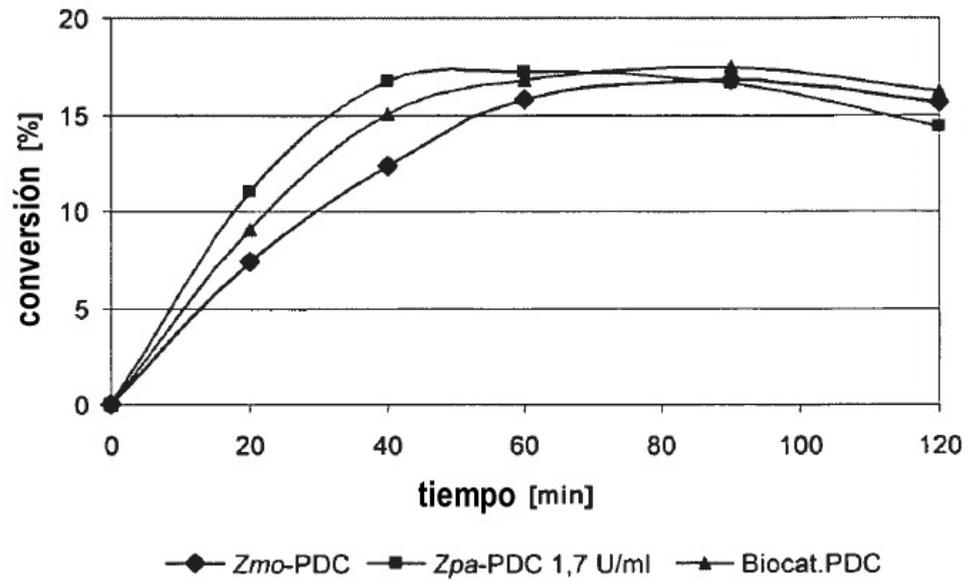


Figura 7

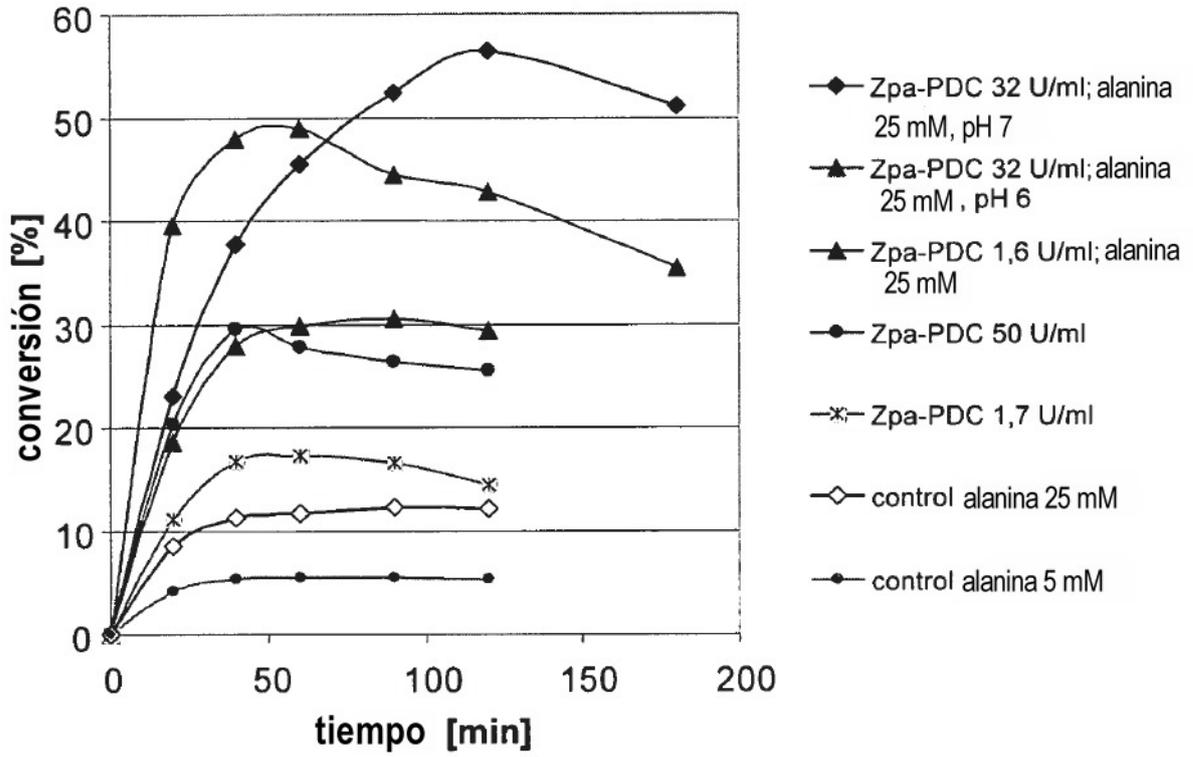


Figura 8

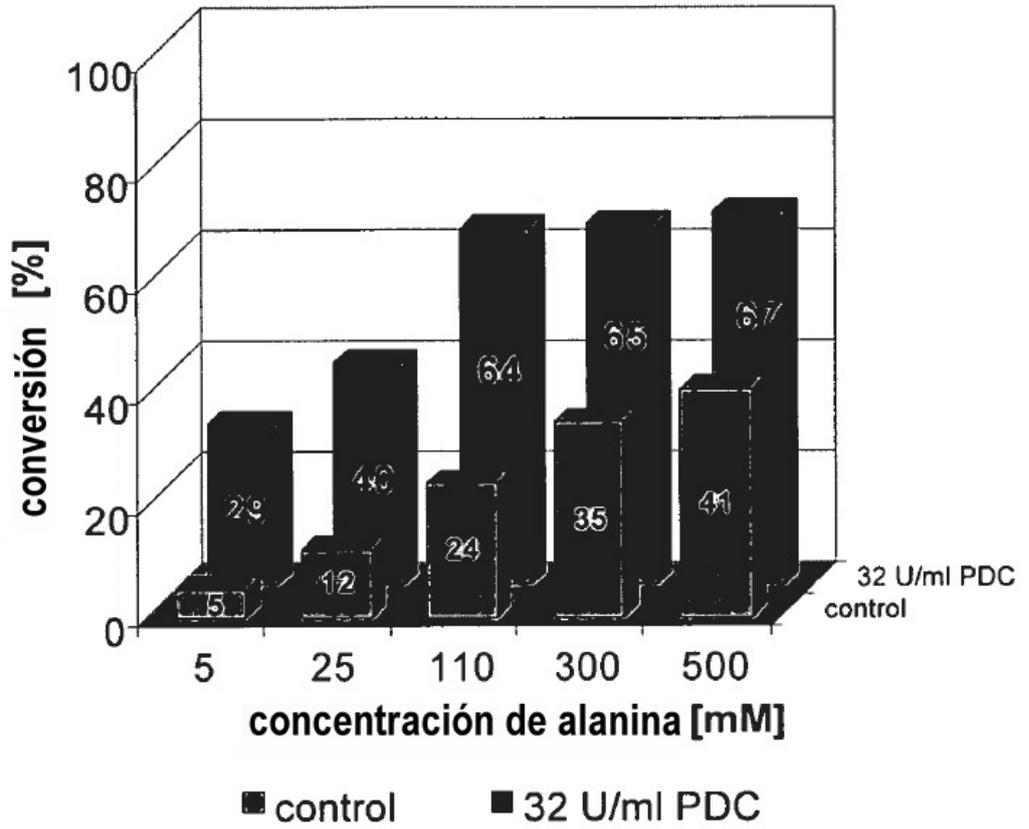


Figura 9

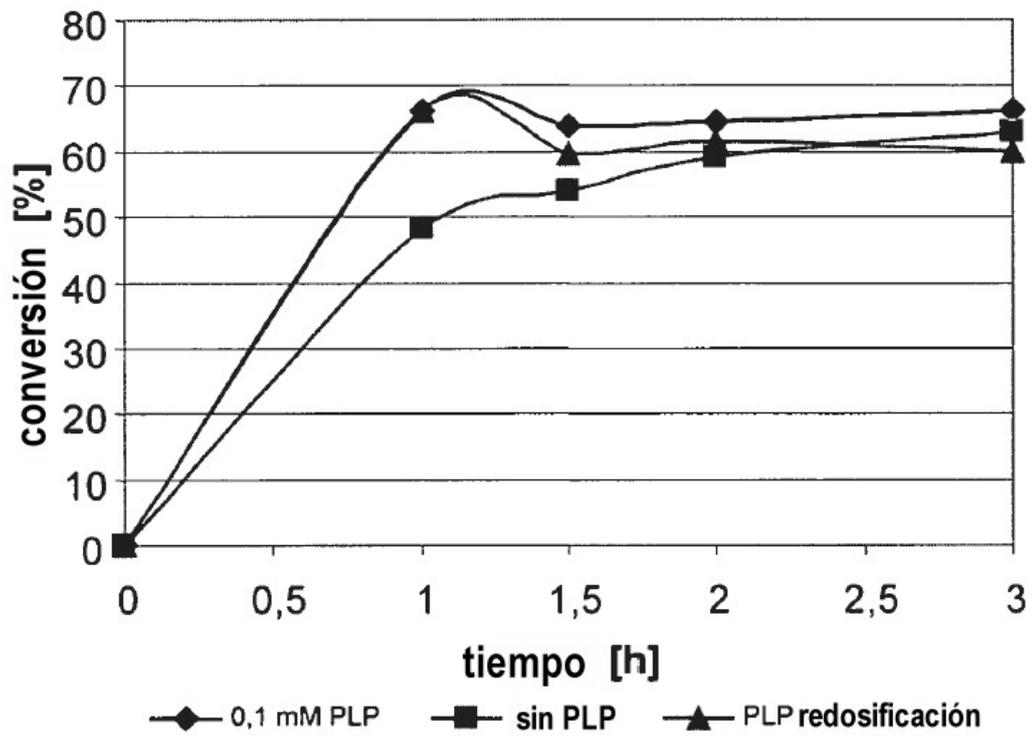


Figura 10

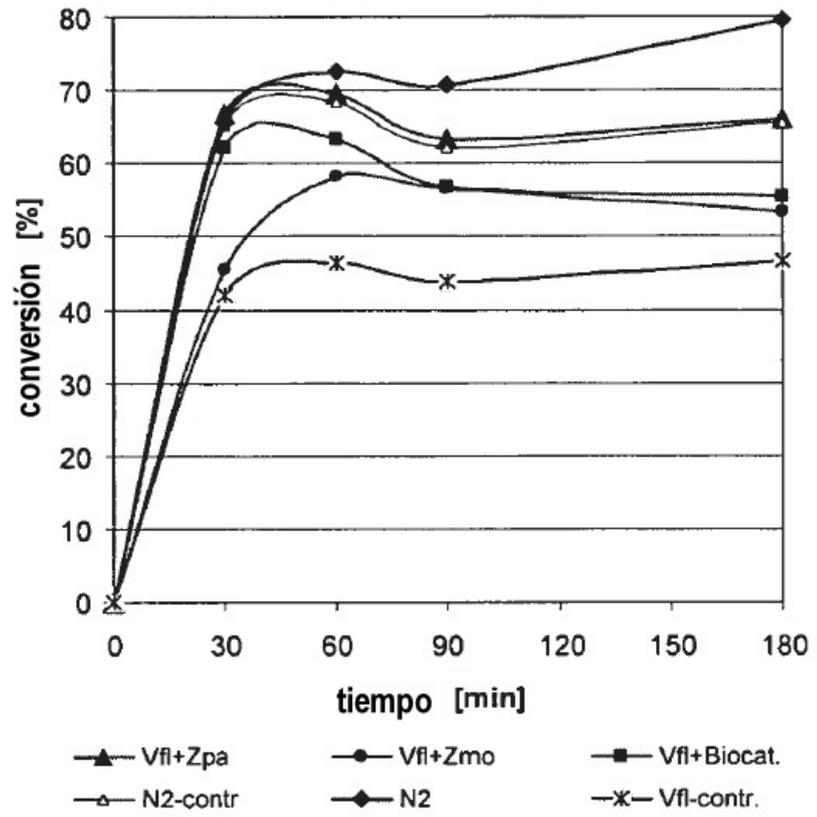


Figura 11

