

TORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

02 101332 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 02101332 00000000
Fecha (AMD): 2002-11-07 17:06:38
Trámite : 011 PCT-PATENT 379/FASE NACI 4.
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONESFORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: **AVECIA LIMITED**Dirección: Hexagón House, Blackley, Manchester
M9 8ZS, Reino UnidoNacionalidad o Domicilio: Reino Unido
Lugar de Constitución: Reino Unido

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: **RAMIRO CASTRO DUQUE**

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 170.322 TP_1003

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Robert Antony Holt, Andrew John Blacker, Christopher David Reeve

Dirección: Belasis Avenue, P.O. Box 2, Billingham, Cleveland TS23 1YN, GB; Leeds
Road, P.O. Box 521, Huddersfield, West Yorkshire HD2 1GA, GB; Belasis Avenue, P.O.
Box 2, Billingham, Cleveland TS23 1YN, Reino Unido (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB01/01915Fecha 01-05-2001Publicación Internacional No. WO 01/85975 A1Fecha 15-11-20016 Título (54): **PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE ÉSTERES DIHIDROXI Y SUS
DERIVADOS**7 Clasificación Internacional (51) C 12 P 7/62; C 07C 69/675

8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

09-05-2000

(31) Número de Solicitud

0011120.39 Comprobante de pago No. 02-72.351 y 02-73.256Fecha 07-11-2002

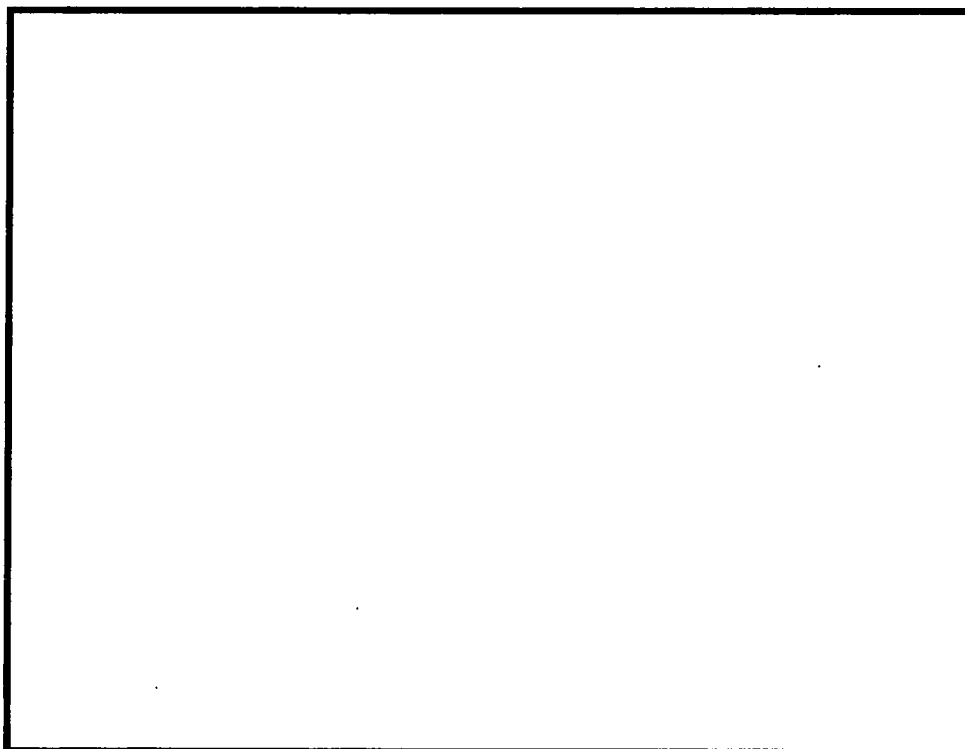
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$378.000
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. \$106.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: RAMIRO CASTRO DUQUE

FIRMA:

C.C. 170.322 de Bogotá T.P. 1003 del C.S.J.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02101332 00000000 Folios: 41
Fecha (AMD): 2002-11-07 17:06:38
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 73,256
FECHA : OCTUBRE 31 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	VR. PAGO
BRY. & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	1326849	31/10/2002	7,126,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
		TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176009-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02101332 00000000

Folios: 41

Fecha (AMD): 2002-11-07 17:06:38

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 72,351
FECHA : OCTUBRE 28 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	1326765	28/10/2002	3,995,000.00

***** CONCEPTO *****

CAN.	ENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	B2 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NO	106,000.00
		TOTAL	106,000.00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

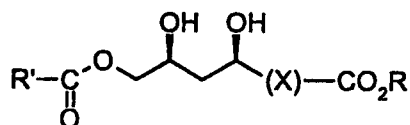
Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

25

PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE ÉSTERES DIHIDROXI Y SUS DERIVADOS

La presente invención concierne con un proceso estéreo selectivo para la preparación de ésteres di-hidroxi, y sus derivados.

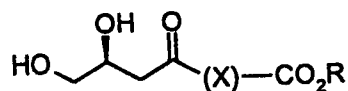
De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (1)



Fórmula 1

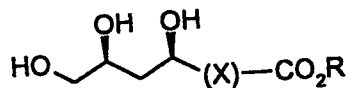
que comprende

- a) la reducción estéreo selectiva de un compuesto de fórmula (2)



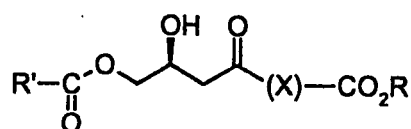
Fórmula 2

para producir un compuesto de fórmula (3), y



Fórmula 3

- b) la esterificación del compuesto de fórmula (3) en presencia de un compuesto de fórmula $R''-O-COR'$ y una enzima lipasa o hidrolasa así para formar el compuesto de fórmula (1); o
- c) la esterificación de un compuesto de fórmula (2) en presencia de un compuesto de fórmula $R''-O-COR'$ y una enzima lipasa o hidrolasa así para formar el compuesto de fórmula (4), y



Fórmula 4

- d) la reducción estereo selectiva de un compuesto de fórmula (4) para producir un compuesto de fórmula (1)

donde

X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo opcionalmente sustituido

R y R'' cada uno independientemente representa un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

Los grupos hidrocarbilo representados por X, R, R' o R'' pueden sustituirse por uno o más sustituyentes, y pueden per-sustituirse, por ejemplo per-halogenado. Ejemplos de sustituyentes incluyen halo, especialmente flúor y cloro, alcoxi, tal como C_{1-4} alcoxi, y oxo.

Preferiblemente, X representa un grupo de fórmula $-(CH_2)_n-$ donde n es desde 1 a 4, y más preferiblemente aún X representa un grupo de fórmula $-CH_2-$.

R" puede ser un grupo alquilo, tal como un grupo C_{1-6} alquilo, o un grupo alquilcarbonilo, tal como un grupo C_{1-6} alquilcarbonilo, por ejemplo un grupo $CH_3(C=O)-$ o $CF_3(C=O)-$. R" es más preferiblemente aún un grupo vinilo o isopropenilo.

R preferiblemente representa un grupo C_{1-4} alquilo, el cual puede ser lineal o ramificado, y puede sustituirse por uno o más sustituyentes. Más preferiblemente, R representa un grupo t-butil.

R' puede representar un alquilo sustituido, a menudo un grupo C_{1-4} alquilo, tal como un grupo CF_3- o CF_3CH_2- , pero es preferiblemente un grupo C_{1-4} alquilo no sustituido, y más especialmente un grupo metilo.

La reducción estereo selectiva de los compuestos de las fórmulas (2) o (4) emplean preferiblemente métodos de reducción química o microbiana, tal como hidrogenación, hidrogenación de transferencia, reducción de hidrido de metal o deshidrogenasas. Ejemplos de un proceso adecuado de hidrogenación tal como el descrito en Helv. Chim. Acta 69, 803, 1986 (incorporado aquí a modo de referencia) incluyen el uso de entre 0,01 y 10% (p/p) de catalizadores tales como platino, paladio o rodio en soportes heterogéneos tales como carbono, alúmina, sílice usando hidrógeno molecular a entre 1 y 10 bar en un solvente tal como metanol, etanol, t-butanol, dimetilformamida, t-butilmetiléter, tolueno o hexano. Alternativamente se pueden usar catalizadores de hidrogenación homogéneos tales como aquellos descritos en EP0583171 (incorporada aquí a modo de referencia).

Ejemplos de adecuados procesos de hidrogenación de transferencia química incluyen aquellos descritos en Zassinovich, Mestroni y Gladiali, Chem. Rev. 1992, 92, 1051 (incorporados aquí a modo de referencia) o por Fuji y otros en J. Am. Chem. Soc. 118, 2521, 1996 (incorporados aquí a modo de referencia). Preferidos procesos de hidrogenación de transferencia química emplean complejos chiral ligados de metales de transición, tales como rutenio o rodio, especialmente complejos chiral ligados de diamina neutrales aromáticos de rutenio. Preferiblemente, dicha hidrogenación de transferencia química emplea un ácido, especialmente una sal de formato tal como formato de trietilamonio, como la fuente de hidrógeno.

Se pueden usar reactivos de hidruro de metal tal como aquellos descritos en Tet. 1993, 1997, Tet. Asymm. 1990, 1, 307, (incorporado aquí a modo de referencia), o J. Am. Chem. Soc. 1998, 110, 3560 (incorporado aquí a modo de referencia).

Ejemplos de adecuadas reducciones microbianas incluyen contactar el compuesto de fórmula (2) o (4) con un organismo que posee las propiedades de un microorganismo seleccionado a partir de *Beauveria* preferiblemente *Beauveria bassiana*, *Pichia* preferiblemente *Pichia angusta* o *Pichia pastoris*, *trehalophila*, *haplophila* o *membranefaciens*, *Candida* preferiblemente *Candida humicola*, *solani*, *guilliermondii*, *diddenssiae* o *friedrichii*, *Kluyveromyces* preferiblemente *Kluyveromyces drosophilarum*, o *Torulaspora*, preferiblemente *Torulaspora hansenii*. La reducción puede lograrse contactando los compuestos de las fórmulas (2) o (4) con una enzima extractada de los siguientes microorganismos. Más preferiblemente, los compuestos de fórmulas (2) o (4) son contactados con un microorganismo seleccionado de *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*,

Candida guilliermondii, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces fragilis* y *Torulospora hanseni*, o un extracto de los siguientes organismos.

La invención preferiblemente comprende la producción de un compuesto de fórmula (3) reduciendo selectivamente un compuesto de fórmula (2) usando células completas de o extractos de los microorganismos anteriormente mencionados, preferiblemente *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces fragilis* y *Torulospora hanseni*.

La invención se lleva a cabo más preferiblemente usando células completas de los organismos puesto que evita la necesidad de separar la enzima deseada y proporciona co-factores para la reacción.

Cualquiera de las especies de arriba puede usarse pero en muchas modalidades, se ha encontrado que altas conversiones y alta selectividad pueden lograrse mediante el uso de la enzima o las células completas de *Pichia angusta*.

En general un co-factor, normalmente NAD(P)H (nicotinamida adenina di-nucleótido o nicotinamida adenina di-nucleótido fosfato) y un sistema para regenerar el cofactor, por ejemplo glucosa y glucosa deshidrogenasa, se usan con las enzimas para dirigir la reacción. Como adecuados co-factores y mecanismos de reducción están presentes en las células completas se prefiere usar las células completas en un medio nutriente que contiene preferiblemente una adecuada fuente de carbono, que puede incluir uno o más de lo siguiente: una azúcar, por ejemplo,

maltosa, sacarosa o preferiblemente glucosa, un poliol por ejemplo, glicerol o sorbitol, ácido cítrico, o un alcohol inferior, por ejemplo metanol o etanol.

Si las células completas pretenden crecer durante la reacción de fuentes de nitrógeno y fósforo y elementos de trazas pueden estar presentes en el medio. Estos pueden ser aquellos normalmente usados en el cultivo del organismo.

El proceso puede llevarse a cabo agregando un compuesto de fórmula (2) o (4) a un cultivo del organismo que crece en un medio capaz de soportar el crecimiento a una suspensión de las células vivas en un medio que contiene preferiblemente una fuente de carbono pero que falla en uno o más nutrientes necesarios para el crecimiento. Las células muertas pueden también usarse teniendo en cuenta que las necesarias enzimas y co-factores están presentes; si es necesario ellos pueden agregarse a las células muertas.

Si se desea las células pueden ser inmovilizadas en un soporte que es contactado con un compuesto de fórmula (2) o (4) preferiblemente en presencia de una adecuada fuente de carbono como se describió previamente.

El pH es adecuadamente 3,5 a 9, por ejemplo 4 a 9, preferiblemente por lo menos 6,5 y más preferiblemente por lo menos 5,5. Muy adecuadamente un pH de 4 a 5 se usó. El proceso puede adecuadamente llevarse a cabo a una temperatura de 10 a 50°C, preferiblemente 20 a 40°C y más preferiblemente 25 a 35°C. Se prefiere operar bajo condiciones aeróbicas si células completas vivas de los organismos anteriormente

mencionados están presentes. Una velocidad de aeración equivalente a 0,01 a 1,0 volúmenes de aire medida a temperatura y presión estándares por volumen del medio de cultivo por minuto se emplea adecuadamente a las anteriormente mencionadas condiciones de pH y temperatura pero se apreciará que es posible considerable variación. Similares condiciones de pH, temperatura y aeración pueden usarse durante el crecimiento de los organismos si se lleva a cabo separadamente del proceso.

Enzimas purificadas pueden aislarse mediante medios conocidos adecuadamente por centrifugación de una suspensión de células desintegradas y separando una solución clara de desechos, separando la deseada enzima de la solución por ejemplo mediante cromatografía de intercambio de iones adecuadamente con levigado a partir de la columna con líquido de resistencia iónica incrementada y/o por precipitación selectiva mediante la adición de un material iónico, por ejemplo sulfato de amonio. Dichas operaciones pueden repetirse si se desea para mejorar la pureza.

La reducción microbiana de los compuestos de fórmula (2) o (4) se prefiere particularmente, y este proceso forma un segundo aspecto de la presente invención.

En la esterificación de los compuestos de fórmula (2) o (3) se prefiere transesterificar con otro éster, el cual está presente en por lo menos mole equivalencia de mol con respecto al alcohol y es adecuadamente un éster de vinilo (como el producto colateral, el acetaldehído no está involucrado en una reacción posterior). Alternativamente un anhídrido tal como anhídrido acético o anhídrido trifluoroacético, o un éster tal como etilacetato o un éster fluorinado tal

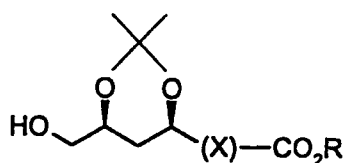
como trifluoroetilacetato puede usarse. Se prefiere que la reacción de esterificación regioespecífica sea llevada a cabo en un solvente orgánico que contiene menos de 1% (p/p) de agua tal como acetonitrilo, etilacetato, tetrahidrofurano, tert-butilmetiléter, tolueno, butanona, pentanona o hexanona a una temperatura de preferiblemente 20 a 75°C, más preferiblemente 25 a 50°C. Los ésteres son preferiblemente ésteres de ácidos alcanoicos inferiores que tienen 2 a 8 átomos de carbono, o sus derivados sustituidos. Opcionalmente una atmósfera inerte puede emplearse, por ejemplo un flujo de nitrógeno puede pasarse a través de la solución.

Las enzimas pueden proporcionarse como tales o como células completas que las comprenden. Se prefiere que puedan ser inmovilizadas en forma tal de facilitar su separación del producto y, si se desea, reutilizadas.

Enzimas preferidas incluyen lipasas tales como lipasa pancreática Porcine, lipasa Candida cylindracea, lipasa Pseudomonas fluorescens, Candida antarctica fracción B tal como la disponible bajo la marca comercial Chirazyme L2, aquellas de Humicola lanuginosa por ejemplo que se vende bajo la Marca Comercial Lipolase o aquellas de Pseudomonas por ejemplo la que se vende bajo la Marca Comercial SAM II y más preferiblemente aquellas de Candida antarctica, por ejemplo la vendida bajo la Marca Comercial Chirazyme.

Los compuestos de fórmula (1) donde R' es CH₃, R es hidrocarbilo opcionalmente sustituido, X es -(CH₂)_n- y n es 1 a 4 forman un tercer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, R es t-butil y más preferiblemente aún, X es -CH₂—.

Compuestos de fórmula (1) son intermediarios útiles para la preparación de compuestos farmacéuticos. Comúnmente, ellos se reaccionan con un grupo protector para 1,3 fracciones dihidroxi tal como 2,2-dimetoxipropano para formar una acetonida tal como se describió en Synthesis 1998, 1713. El grupo $R'-(C=O)-$ puede entonces retirarse selectivamente mediante tratamiento con una solución alcohólica débilmente básica, por ejemplo, solución de K_2CO_3 como se describió en US 5,278,313 o una lipasa ya sea en solución acuosa, o en solución orgánica que contiene suficiente agua para soportar la hidrólisis, para formar un compuesto de fórmula (5):



Fórmula 5

Este proceso para la preparación de compuestos de fórmula (5) forma un cuarto aspecto de la presente invención.

Ejemplo 1

Preparación de (3R,5S) t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato.

A un frasco de fondo redondo agitado de 250ml se cargaron 20ml de acetonitrilo, 0,405g (0,662mmoles) de di- μ -clorobis[(p-cimeno)clororutenio (II)], y 0,492g (1,34mmoles) (1S,2S)-(+)-N(4-toluenosulfonil)-1,2-difeniletilenodiamina. La solución se desoxigenó esparciendo con nitrógeno y posteriormente manteniendo un trípode. Una solución desoxigenada de 26g (0,119mol) ópticamente pura (5S) t-butil 3-

queto-5,6-dihidroxihexanoato en 15ml acetonitrilo se cargó al recipiente de reacción y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. 65ml de una mezcla 5:2 (mol/mol) de ácido fórmico destilado y trietilamina se agregó entonces durante un periodo de 10 minutos y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. A esta solución 80ml de diclorometano y 120ml de bicarbonato de sodio saturado se agregaron lentamente. 70g de cloruro de amonio se cargó a la capa acuosa y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se lavó dos veces más con 90ml de etilacetato, las fracciones orgánicas se combinaron, secaron sobre sulfato de sodio y el solvente se retiró para dar 21,1g de un aceite crudo que contiene principalmente (3R,5S) t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato. La relación de diastereómeros se determinó mediante ^{13}C NMR para ser 5.2:1 (3R:5S): (3S:5S). El material se usó crudo en la siguiente reacción pero puede purificarse mediante cromatografía de columna.

Preparación de (3R,5S) t-butil 6-acetoxi-3,5-dihidroxihexanoato.

A un frasco de fondo redondo de 1l agitado se cargó 700ml de tetrahidrofurano y 70,7g (0,32mol) de (3R,5S) t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato, 41 ml (0,46mol) vinilacetato y 6,3g de la lipasa soportada Chirazyme L2®. Después de 3 horas de agitación a temperatura ambiente la lipasa se retiró mediante tamizado y los volátiles se retiraron mediante destilación bajo vacío. La masa de aceite crudo fue de 78,7g y el principal componente se determinó como (3R,5S) t-butil 6-acetoxi-3,5-dihidroxihexanoato. Este material se usó directamente en la siguiente etapa.

15

Preparación de (4R,6S)-6-[(acetiloxi)metil]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-ácido acético 1,1-dimetilester.

A un frasco de fondo redondo de 1 litro agitado se cargaron 78,7g (3R,5S) t-butil 6-acetoxi-3,5dihidroxihexanoato, 800ml de 2,2-dimetoxipropano y 5,7g p-tolueno ácido sulfónico. Después de 35 minutos la masa de reacción se concentró a la mitad de su volumen y 300ml de diclorometano y 300ml de 1M de bicarbonato de sodio se agregó. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se lavó dos veces más con 150ml de etilacetato. Las fracciones orgánicas se combinaron, secaron sobre sulfato de sodio y los volátiles se retiraron mediante destilación bajo vacío. 92g de un aceite crudo se obtuvo. Esto se purificó primero pasando a través de una columna corta de sílice de destello y levigó con hexano y luego hexano: etilacetato 85:15 (v/v), y luego se cristalizó el material 3 veces a partir de hexano para dar 22,17g (4R,6S)-6-[(acetiloxi)metil]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-ácido acético, 1,1dimetilester que mediante chiral GC se determinó como 99,9%de.

Preparación de (4R,6S)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-ácido acético, 1,1dimetilester.

A un frasco de fondo redondo de 500ml agitado se cargaron 22,17g de (4R,6S)-6-[(acetiloxi)metil]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-ácido acético, 1,1-dimetilester, 250ml de metanol y 5,05g de carbonato de potasio triturado. La reacción se agitó durante 35 minutos hasta que la hidrólisis fue completa, entonces el carbonato de potasio se retiró por tamizado, la masa de reacción se concentró y 150ml 5% (p/p) de salmuera y 150ml de tolueno se agregaron. La capa orgánica se separó y la acuosa se lavó dos veces más con 250ml de tolueno. Las capas orgánicas se combinaron, se

10
16

lavarón tres veces con 15% (p/p) de salmuera y el solvente se retiró mediante destilación por vacío para dar 17,78g de un aceite transparente, el cual se determinó ser >99% (4R,6S)-6-(hidroximetil]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-ácido acético, 1,1-dimetilester.

Ejemplo 2

Preparación de (5S) tert-butil 6-acetoxi-5-hidroxi-3-quetohexanoato.

A un frasco de fondo redondo de 250ml agitado se cargaron 2,32g (0,0106moles) de (5S) tert-butil 5,6-dihidroxi-3-quetohexanoato, 40ml de tetrahidrofurano, 0,98ml (0,0106 moles) vinil acetato y 0,22g de la lipasa soportada Chirazyme L2 ®. Después de 20 minutos la lipasa se retiró por tamizado y los volátiles se retiraron por destilación bajo vacío, para dar 2,96g de un aceite crudo que se caracterizó por NMR como (5S) tert-butil 6-acetoxi-5-hidroxi-3-quetohexanoato.

Ejemplo 3

Preparación de (3R,5S) t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato.

Pichia angusta NCYC R230 (depositado bajo las previsiones del Tratado de Budapest en May 18, 1995) creció en un Braun Biostat Q sistema multi-fermentador en el siguiente medio (por litro): glucosa 40 g; MgSO₄, 1.2 g; K₂SO₄, 0,21 g; KH₂PO₄, 0,69 g; H₃PO₄ (concentrado), 1 ml; extracto de levadura (Oxoid), 2 g; FeSO₄.7H₂O, 0,05 g; anti-espuma (EEA 142 Foammaster), solución de elementos de trazas, 1 ml (esta solución contenía por litro CuSO₄.5H₂O, 0,02 g; MnSO₄.4H₂O, 0,1 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,1 g; CaCO₃, 1,8 g.

*Pichia
NCYC R2*

Cada uno de los 4 fermentadores se cargó con 250 ml de medio y esterilizó mediante autoclave. El pH se ajustó a 4,5 usando una solución 7 molar de hidróxido de amonio, la temperatura se estableció a 28°C, el flujo de aire se estableció a 300 ml/minuto y la velocidad del agitador se estableció a 1200 rpm. Los fermentadores se inocularon con células tomadas de placas de agar (2% agar) que comprende el mismo medio descrito arriba excepto porque la concentración de glucosa fue de 20 g/litro. Después de 22 horas de crecimiento en los fermentadores la reacción de bioreducción se inició mediante la adición de (5S) t-butil 3-queto-5,6-dihidroxihexanoato; dos de los fermentadores se cargaron con 3,75 ml cada uno y los otros dos se cargaron con 5 ml cada uno.

La reacción se continuó durante adicionales 78 horas hasta el 100% de conversión del sustrato. Durante este periodo el cultivo se alimentó con una solución al 50% de glucosa a una velocidad de 1 a 3 gramos de glucosa/litro de cultivo/hora para mantener la viabilidad de las células y proporcionar una fuente de potencia de reducción. Las reacciones se terminaron mediante retiro de las células por centrifugación. A la recuperada célula libre de sobre nadante se agregó cloruro de sodio a una concentración final de 20% p/v y la mezcla se extrajo tres veces con un volumen igual de acetonitrilo. Los extractos de acetonitrilo en charcos se secaron con sulfato de sodio anhidro y el solvente se retiró bajo presión reducida en un evaporador rotativo (temperatura del baño de agua 45°C) para lograr un aceite viscoso amarillo pálido. La identidad del producto de cada reacción se confirmó como (3R,5S) t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato y el exceso diastereomérico de cada una de las muestras se da en la tabla de abajo

experimento	exceso diastereomérico (%)
1	99,6
2	99,6
3	99,4
4	99,6

Ejemplo 4

Preparación de (3R,5S) t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato.

Pichia angusta NCYC R320 (depositada bajo las previsiones del Tratado de Budapest en Mayo 18, 1995) creció en un sistema multi-fermentador Braun Biostat Q en el siguiente medio (que contiene, por litro): glucosa, 20 g; sulfato de amonio, 10 g; extracto de levadura (Oxoid), 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g; KH_2PO_4 , 0,69 g; K_2SO_4 , 0,21 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g; H_3PO_4 (concentrado), 1 ml; EEA 142 anti-espuma "foammaster", 0,5 ml; solución de elementos de trazas, 1 ml (esta solución contenía por litro $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, 2,85g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,075 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g; ácido sulfúrico (concentrado), 1 ml).

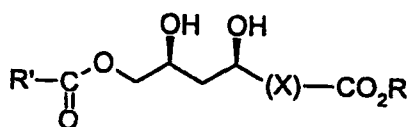
Un fermentador se cargó con 250 ml de medio y se esterilizó mediante autoclave. El pH se ajustó a 5,0 usando una solución 2 molar de hidróxido de sodio. La temperatura se estableció a 28°C, el flujo de aire se estableció a 250 ml minuto⁻¹ y la velocidad del agitador se estableció a 1 200 rpm. El fermentador se inoculó con 2,5ml de una suspensión de células en agua estéril desionizada preparada de una placa de agar de *Pichia angusta* NCYC R320. Después de 17 horas se inició en crecimiento de bioreducción mediante la adición de 6,36g 5(S) t-butil 3-queto-5,6-dihidroxihexanoato como una solución acuosa. En el mismo momento una glucosa se inició una alimentación al fermentador a una velocidad de 2g

de glucosa $L^{-1} h^{-1}$. La reacción se continuó durante adicionales 78 horas en cuyo punto se ha logrado 96% de conversión del sustrato. El material de partida y el producto se detectaron por HPLC (columna Hichrom S5 CN-250A, temperatura 35°C, fase móvil: acetonitrilo acuoso TFA (0,1%) 95:5, rata de flujo 1 ml minuto⁻¹, volumen de inyección 5 ml, detector de índice refractivo). La reacción se terminó mediante el retiro de células centrifugando a 4 000 x g por 20 minutos. El pH del sobre nadante libre de células recuperado se ajustó a 7,5 usando 2M de NaOH. $MgSO_4 \cdot 1,6H_2O$ (15 % p/v basado en anhidro) se disolvió en el sobre nadante libre de células y la solución resultante se extrajo dos veces con un igual volumen de 2-pentanona. Las fases solventes se recogieron y el solvente se retiró bajo presión reducida en una evaporador rotativo a 45°C logrando un aceite viscoso naranja. Este se volvió a disolver en 50 ml seco, se destiló 2-pentanona y nuevamente el solvente se retiró mediante evaporación rotativa para lograr t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato (5,08 g, 80 % obtenido aislado). El exceso diastereomérico se determinó como sigue; una muestra de t-butil 3,5,6-trihidroxihexanoato (30 mg) se derivó mediante la reacción durante por lo menos 10 minutos a temperatura ambiente en un exceso de anhídrido trifluoroacético, el exceso de anhídrido se retiró bajo una corriente de nitrógeno seco y el aceite residual se diluyó con diclorometano (1 ml). La muestra se analizó usando Chiralcel Dex CB columna (25 metros) a una temperatura de 140°C (isoterma). Los diastereómeros se levigaron a 14,4 minutos (3R,5S diastereómeros) y 15,7 minutos (3S,5S diastereómeros). El exceso diastereomérico de la muestra se encontró mediante este método como de 99,7%.

20

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (1)

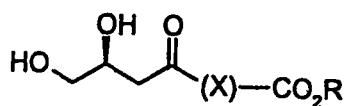


Fórmula 1

que comprende ya sea

- a) la reducción estereo selectiva de un compuesto de fórmula (2)

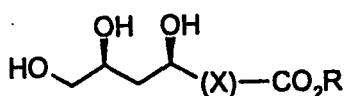
como?



Fórmula 2

Procesos diferentes

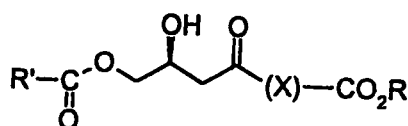
para producir un compuesto de fórmula (3), y



Fórmula 3

solamente

- b) esterificación del compuesto de fórmula (3) en presencia de un compuesto de fórmula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ y una enzima lipasa o hidrolasa para formar así el compuesto de fórmula (1); o
- c) esterificación de un compuesto de fórmula (2) en presencia de un compuesto de fórmula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ y una enzima lipasa o hidrolasa para formar así el compuesto de fórmula (4), y



Fórmula 4

- d) la reducción estereo selectiva de un compuesto de fórmula (4) para producir un compuesto de fórmula (1)

donde

X representa un grupo enlazante hidrocarbilo opcionalmente sustituido

R y R'' representan cada uno independientemente un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y R' representa un hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde X representa un grupo de fórmula $-\text{CH}_2-$.

3. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde R'' representa un grupo vinilo o isopropenilo.

4. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde R' representa un grupo C_{1-6} alquilo sustituido o no sustituido.

5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, donde R' representa un grupo metilo.

6. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde los compuestos de fórmulas (2) o (4) se reducen por contacto con

22
22

un organismo que posee las propiedades de un microorganismo seleccionado de *Beauveria*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces* o *Torulaspora* genera o una enzima extractada de allí.

7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, donde los compuestos de fórmulas (2) o (4) se reduce por contacto con un organismo seleccionado a partir del grupo que consiste de *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosopliarum* y *Torulospira hansenii*, o una enzima extractada de allí.

8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde se emplean células completas.

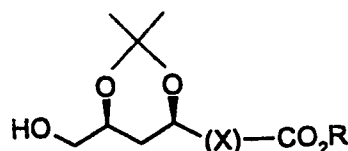
9. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 o 8, donde los compuestos de fórmulas (2) o (4) se reducen a un pH de desde 4 a 5.

10. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde los compuestos de fórmulas (2) o (3) se esterifican en presencia de una enzima seleccionada a partir del grupo que consiste de lipasa pancreática Porcine, lipasa *Candida cylindracea*, lipasa *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica* fracción B y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

11. Un proceso acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el compuesto de fórmula $R''O-COR'$ es vinilacetato.

12. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (5)

±



Formula 5

que comprende:

- a) preparar un compuesto de fórmula (1) mediante un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente;
- b) reaccionar el compuesto de fórmula (1) con 2,2-dimetoxipropano para formar una acetona; y

- c) retirar el grupo $R'-(C=O)-$; donde

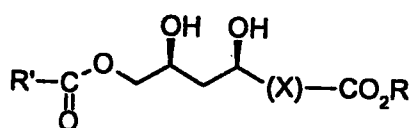
X representa un grupo de enlace de hidrocarbilo opcionalmente sustituido

R representa un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el $R'-(C=O)-$ se retira mediante tratamiento con una solución alcohólica básica.

14. Un compuesto de fórmula (1):



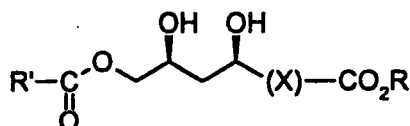
Fórmula 1

donde R' es CH_3 , R es hidrocarbilo opcionalmente sustituido, X es $-(CH_2)_n-$ y n es 1 a 4.

24

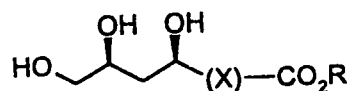
15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, donde R es t-butil y X es $-\text{CH}_2-$.

16. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (1)



Fórmula 1

que comprende la esterificación de un compuesto de fórmula (3)



Fórmula 3

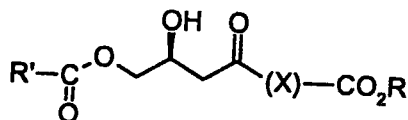
en presencia de un compuesto de fórmula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ y una enzima lipasa o hidrolasa para formar así el compuesto de fórmula (1);

donde

X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo opcionalmente sustituido
R y R'' representan cada uno independientemente un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

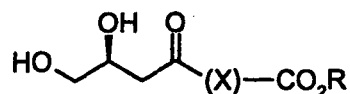
17. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (4)



Fórmula 4

25

que comprende la esterificación de un compuesto de fórmula (2)



Fórmula 2

en presencia de un compuesto de fórmula $\text{R}''\text{-O-COR}'$ y una enzima lipasa o hidrolasa para formar así el compuesto de fórmula (4);

donde

X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo opcionalmente sustituido
R y R'' representan cada uno independientemente un grupo hidrocarbilo opcionalmente sustituido, y

R' representa un hidrocarbilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

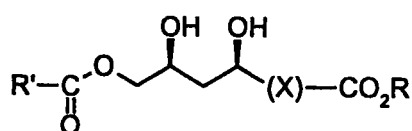
18. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde R' es CH_3 , R es t-butil y X es $-\text{CH}_2-$.

19. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16, 17 o 18, donde R'' es un grupo vinilo o isopropenilo.

20. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde la enzima se selecciona a partir del grupo que consiste de lipasa pancreática Porcine, lipasa Candida cylindracea, lipasa Pseudomonas fluorescens, Candida antarctica fracción B y lipasa de Humicola lanuginosa.

EXTRACTO
PROCESO FOR LA PREPARACIÓN DE ÉSTERES DIHIDROXI Y
SUS DERIVADOS

Se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (1)



Fórmula 1

donde R y R' representan grupos hidrocarbilo opcionalmente sustituidos y X representa un grupo enlazante de hidrocarbilo. El proceso comprende ya sea la reducción estereo selectiva del grupo queto en un precursor queto dihidroxi seguido por la esterificación selectiva de un hidroxilo primario, o la esterificación selectiva de un hidroxilo primario de un precursor queto dihidroxi seguido por la reducción estereo selectiva del grupo queto.

PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/85975
PCT/GB01/01915

POICR 2/27

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

REVELL, Christopher
Avecia Limited
Intellectual Property Group
Hexagon House, P.O. Box 42
Blackley
Manchester M9 8ZS
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 15 November 2001 (15.11.01)		
Applicant's or agent's file reference SMC 60423/WO		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/GB01/01915	International filing date (day/month/year) 01 May 2001 (01.05.01)	Priority date (day/month/year) 09 May 2000 (09.05.00)
Applicant AVECIA LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AG,AL,AM,AP,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD, MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 15 November 2001 (15.11.01) under No. WO 01/85975

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.91.11
--	---

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 November 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/85975 A1

(51) International Patent Classification⁷: **C12P 7/62**,
17/06, C07C 69/675 // C12N 9/20, C07D 319/04

(74) Agents: **REVELL, Christopher et al.**; Avecia Limited,
Intellectual Property Group, Hexagon House, P.O. Box 42,
Blackley, Manchester M9 8ZS (GB).

(21) International Application Number: **PCT/GB01/01915** ✓

(22) International Filing Date: 1 May 2001 (01.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0011120.3 9 May 2000 (09.05.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **AVECIA LIMITED** [GB/GB]; Hexagon House, Blackley, Manchester M9 8ZS (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **HOLT, Robert, Antony** [GB/GB]; Belasis Avenue, P.O. Box 2, Billingham, Cleveland TS23 1YN (GB). **BLACKER, Andrew, John** [GB/GB]; Leeds Road, P.O. Box 521, Huddersfield, West Yorkshire HD2 1GA (GB). **REEVE, Christopher, David** [GB/GB]; Belasis Avenue, P.O. Box 2, Billingham, Cleveland TS23 1YN (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

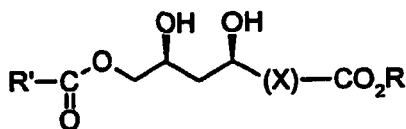
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF DIHYDROXY ESTERS AND DERIVATIVES THEREOF



(1)

(57) Abstract: A process is provided for the preparation of a compound of Formula (1) wherein R and R' represent optionally substituted hydrocarbyl groups and X represents a hydrocarbyl linking group. The process comprises either the stereoselective reduction of the keto group in a dihydroxy keto precursor followed by selective esterification of a primary hydroxy, or selective esterification of a primary hydroxy of a dihydroxy keto precursor followed by stereoselective reduction of the keto group.

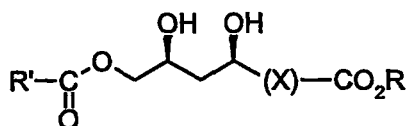
WO 01/85975 A1

29/29

PROCESS FOR THE PREPARATION OF DIHYDROXY ESTERS AND DERIVATIVES THEREOF

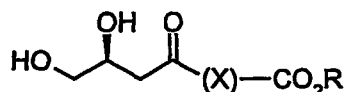
The present invention concerns a stereoselective process for the preparation of dihydroxy esters, and derivatives thereof.

According to a first aspect of the present invention, there is provided a process for the preparation of a compound of formula (1)



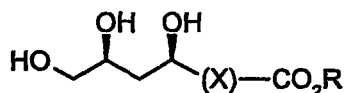
Formula 1

which comprises either a) the stereoselective reduction of a compound of formula (2)



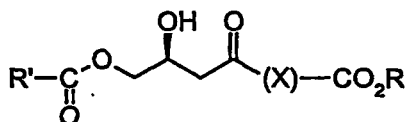
Formula 2

to produce a compound of formula (3), and



Formula 3

- b) Esterification of the compound of formula (3) in the presence of a compound of formula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ and a lipase or hydrolase enzyme thereby to form the compound of formula (1); or
- c) Esterification of a compound of formula (2) in the presence of a compound of formula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ and a lipase or hydrolase enzyme thereby to form the compound of formula (4), and



Formula 4

d) the stereoselective reduction of a compound of formula (4) to produce a compound of formula (1)

wherein

X represents an optionally substituted hydrocarbyl linking group

5 R and R" each independently represent an optionally substituted hydrocarbyl group, and R' represents an optionally substituted hydrocarbyl, preferably an optionally substituted alkyl group.

10 Hydrocarbyl groups represented by X, R, R' or R" may be substituted by one or more substituents, and may be per-substituted, for example perhalogenated. Examples of substituents include halo, especially fluoro and chloro, alkoxy, such as C₁₋₄alkoxy, and oxo.

Preferably, X represents a group of formula $-(CH_2)_n-$ where n is from 1 to 4, and most preferably X represents a group of formula $-CH_2-$.

15 R" may be an alkyl group, such as a C₁₋₆ alkyl group, or an alkylcarbonyl group, such as a C₁₋₆alkylcarbonyl group, for example a CH₃(C=O)- or CF₃(C=O)- group. R" is most preferably a vinyl or isopropenyl group.

R preferably represents a C₁₋₆ alkyl group, which may be linear or branched, and may be substituted by one or more substituents. Most preferably, R represents a t-butyl group.

20 R' may represent a substituted alkyl, often C₁₋₆ alkyl group, such as a CF₃- or CF₃CH₂- group, but is preferably an unsubstituted C₁₋₆ alkyl group, and most especially a methyl group.

25 The stereoselective reduction of the compounds of formulae (2) or (4) preferably employ chemical or microbial reduction methods, such as hydrogenation, transfer hydrogenation, metal hydride reduction or dehydrogenases. Examples of a suitable hydrogenation process such as that described in Helv. Chim. Acta 69, 803, 1986 (incorporated herein by reference) include the use of between 0.01 and 10% (w/w) of catalysts such as platinum, palladium or rhodium on heterogeneous supports such as carbon, alumina, silica using molecular hydrogen at between 1 and 10 bar in a solvent
30 such as methanol, ethanol, t-butanol, dimethylformamide, t-butylmethylether, toluene or hexane. Alternatively homogenous hydrogenation catalysts such as those described in EP0583171 (incorporated herein by reference) may be used.

35 Examples of suitable chemical transfer hydrogenation processes include those described in Zassinovich, Mestroni and Gladiali, Chem. Rev. 1992, 92, 1051 (incorporated herein by reference) or by Fuji et al in J. Am. Chem. Soc. 118, 2521, 1996 (incorporated herein by reference). Preferred chemical transfer hydrogenation processes employ chiral ligated complexes of transition metals, such as ruthenium or rhodium, especially chiral diamine-ligated neutral aromatic ruthenium complexes. Preferably, such

32/30

a chemical transfer hydrogenation employs an acid, especially a formate salt such as triethylammonium formate, as the hydrogen source.

Metal hydride reagents such as those described in Tet.1993, 1997, Tet. Asymm. 1990,1, 307, (incorporated herein by reference), or J. Am. Chem. Soc. 1998, 110, 3560 (incorporated herein by reference) can be used.

Examples of suitable microbial reductions include contacting the compound of formula (2) or (4) with an organism possessing the properties of a microorganism selected from *Beauveria* preferably *Beauveria bassiana*, *Pichia* preferably *Pichia angusta* or *Pichia pastoris*, *trehalophila*, *haplophila* or *membranefaciens*, *Candida* preferably *Candida humicola*, *solani*, *guilliermondii*, *diddenssiae* or *friedrichii*, *Kluyveromyces* preferably *Kluyveromyces drosophilum*, or *Torulaspora* preferably *Torulaspora hansenii*. The reduction may be achieved by contacting the compounds of formulae (2) or (4) with an enzyme extracted from the foregoing microorganisms. Most preferably, the compounds of formulae (2) or (4) are contacted with a microorganism selected from *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosophilum* and *Torulaspora hansenii*, or an extract from the foregoing organisms.

The invention preferably comprises producing a compound of formula (3) by selectively reducing a compound of formulae (2) using whole cells of or extracts from the aforementioned microorganisms, preferably *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosophilum* and *Torulaspora hansenii*.

The invention is most preferably carried out using whole cells of the organisms as this avoids the need to separate the desired enzyme and provides co-factors for the reaction.

Any of the above species may be used but in many embodiments, it has been found that high conversions and high selectivity can be achieved by the use of the enzyme or whole cells of *Pichia angusta*.

In general a co-factor, normally NAD(P)H (nicotinamide adenine dinucleotide or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) and a system for re-generating the co-factor, for example glucose and glucose dehydrogenase, are used with the enzymes to drive the reaction. As suitable co-factors and reduction mechanisms are present in the whole cells it is preferred to use the whole cells in a nutrient medium which preferably contains a suitable carbon source, which may include one or more of the following: a sugar, e.g. maltose, sucrose or preferably glucose, a polyol e.g. glycerol or sorbitol, citric acid, or a lower alcohol, for example methanol or ethanol.

If whole cells are intended to grow during the reaction nitrogen and phosphorus sources and trace elements should be present in the medium. These may be those normally used in culturing the organism.

The process may be carried out by adding a compound of formula (2) or (4) to a culture of the growing organism in a medium capable of supporting growth or to a suspension of the live cells in a medium which preferably contains a carbon source but which lacks one or more nutrients necessary for growth. Dead cells may also be used providing the necessary enzymes and co-factors are present; if necessary they may be added to the dead cells.

If desired the cells may be immobilised on a support which is contacted with compound of formula (2) or (4) preferably in the presence of a suitable carbon source as previously described.

The pH is suitably 3.5 to 9, for example 4 to 9, preferably at most 6.5 and more preferably at most 5.5. Very suitably a pH of 4 to 5 is used. The process may suitably be carried out at a temperature of 10 to 50°C, preferably 20 to 40°C and more preferably 25 to 35°C. It is preferred to operate under aerobic conditions if live whole cells of the aforesaid organisms are present. An aeration rate equivalent to 0.01 to 1.0 volumes of air measured at standard temperature and pressure per volume of the culture medium per minute is suitably employed at the aforesaid conditions of pH and temperature but it will be appreciated that considerable variation is possible. Similar pH, temperature and aeration conditions may be used during growth of the organisms if this is carried out separately from the process.

Purified enzymes may be isolated by known means suitably by centrifuging a suspension of disintegrated cells and separating a clear solution from debris, separating the desired enzyme from the solution for example by ion exchange chromatography suitably with elution from the column with liquid of increasing ionic strength and/or by selective precipitation by the addition of an ionic material, for example ammonium sulphate. Such operations may be repeated if desired to enhance purity.

The microbial reduction of compounds of formula (2) or (4) is particularly preferred, and this process forms a second aspect of the present invention.

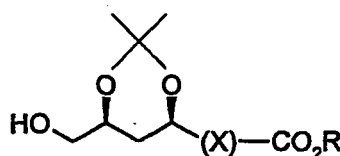
In the esterification of compounds of formula (2) or (3) it is preferred to transesterify with another ester, which is present in at least mole equivalence with respect to the alcohol and is suitably a vinyl ester (as the by-product, acetaldehyde is not involved in a back-reaction). Alternatively an anhydride such as acetic anhydride or trifluoroacetic anhydride, or an ester such as ethylacetate or a fluorinated ester such as trifluoroethylacetate may be used. It is preferred that the regiospecific esterification reaction be carried out in an organic solvent containing less than 1% (w/w) water such as acetonitrile, ethylacetate, tetrahydrofuran, tert-butylmethylether, toluene, butanone, pentanone or hexanone at a temperature of preferably 20 to 75°C, more preferably 25 to 50°C. The esters are preferably esters of lower alkanolic acids having 2 to 8 carbon atoms, or substituted derivatives thereof. Optionally an inert atmosphere may be employed, for example a flow of nitrogen may be passed through the solution.

The enzymes may be provided as such or as whole cells comprising them. It is preferred that they be immobilised so as to facilitate their separation from the product and, if desired, re-use.

Preferred enzymes include lipases such as Porcine pancreatic lipase, *Candida cylindracea* lipase, *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Candida antarctica* fraction B such as that available under the trade mark Chirazyme L2, those from *Humicola lanuginosa* for example that sold under the Trade Mark Lipolase or those from *Pseudomonas* for example that sold under the Trade Mark SAM II and more preferably those from *Candida antarctica*, for example that sold under the Trade Mark Chirazyme.

Compounds of formula (1) wherein R' is CH₃, R is optionally substituted hydrocarbyl, X is -(CH₂)_n- and n is 1 to 4 form a third aspect of the present invention. Preferably, R is t-butyl and most preferably, X is -CH₂-.

Compounds of formula (1) are useful intermediates for the preparation of pharmaceutical compounds. Commonly, they are reacted with a protecting group for 1,3-dihydroxy moieties such as 2,2-dimethoxypropane to form an acetonide as described in Synthesis 1998, 1713. The group R'-(C=O)- may then be selectively removed by treatment with weakly basic alcoholic solution eg K₂CO₃ solution as described in US5,278,313 or a lipase either in aqueous solution, or in organic solution containing sufficient water to support hydrolysis, to form a compound of formula (5):



Formula 5

This process for the preparation of compounds of formula (5) forms a fourth aspect of the present invention.

Example 1

Preparation of (3R,5S) t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate.

To a stirred 250ml round bottom flask 20ml acetonitrile, 0.405g (0.662mmoles) of di-μ-chlorobis[(p-cymene)chlororuthenium (II)], and 0.492g (1.34mmoles) (1S,2S)-(+)-N-(4-toluenesulfonyl)-1,2-diphenylethylenediamine were charged. The solution was de-oxygenated by sparging with nitrogen and thereafter maintaining a trickle. A de-oxygenated solution of 26g (0.119mol) optically pure (5S) t-butyl 3-keto-5,6-dihydroxyhexanoate in 15ml acetonitrile was charged to the reaction vessel and the solution stirred at ambient temperature for 20 minutes. 65ml of a 5:2 (mol/mol) mixture of distilled formic acid and triethylamine were then added over a period of 10 minutes and

the reaction mixture stirred at ambient temperature for 48 hours. To this solution 80ml dichloromethane and 120ml saturated sodium bicarbonate were slowly added. 70g ammonium chloride was charged to the aqueous layer and the organic layer separated. The aqueous layer was washed thrice more with 90ml ethylacetate, the organic fractions
5 combined, dried over sodium sulfate and the solvent removed to give 21.1g of a crude oil containing mainly (3R,5S) t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate. The ratio of diastereomers was determined by ^{13}C NMR to be 5.2 : 1 (3R:5S) : (3S:5S). The material was used crude in the next reaction but could be purified by column chromatography.

10 Preparation of (3R,5S) t-butyl 6-acetoxy-3,5-dihydroxyhexanoate.

To a stirred 1l round bottom flask 700ml tetrahydrofuran and 70.7g (0.32mol) of (3R,5S) t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate, 41ml (0.46mol) vinylacetate and 6.3g of the supported lipase Chirazyme L2 TM were charged. After 3 hours stirring at ambient temperature the lipase was removed by screening and the volatiles removed by distillation
15 under vacuum. The mass of crude oil was 78.7g and the major component was determined to be (3R,5S) t-butyl 6-acetoxy-3,5-dihydroxyhexanoate. This material was used directly in the next stage.

20 Preparation of (4R,6S)-6-[(acetyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4-acetic acid, 1,1-dimethylethylester.

To a stirred 1 litre round bottom flask 78.7g (3R,5S) t-butyl 6-acetoxy-3,5-dihydroxyhexanoate, 800ml of 2,2-dimethoxypropane and 5.7g p-toluenesulfonic acid were charged. After 35 minutes the reaction mass was concentrated to half its volume and 300ml of dichloromethane and 300ml of 1M sodiumbicarbonate added. The organic
25 layer was separated and the aqueous layer washed thrice more with 150ml ethylacetate. The organic fractions were combined, dried over sodium sulfate and the volatiles removed by distillation under vacuum. 92g of a crude oil was obtained. This was purified first by passing through a short column of flash silica and eluting with hexane and then hexane:ethylacetate 85:15 (v/v), and then crystallising the material 3 times from hexane
30 to give 22.17g (4R,6S)-6-[(acetyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4-acetic acid, 1,1-dimethylethylester which by chiral GC was determined to be 99.9%de.

35 Preparation of (4R,6S)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4-acetic acid, 1,1-dimethylethylester.

To a 500ml stirred round bottom flask 22.17g of (4R,6S)-6-[(acetyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4-acetic acid, 1,1-dimethylethylester, 250ml methanol and 5.05g crushed potassium carbonate were charged. The reaction was stirred for 35 minutes until the hydrolysis was complete, then the potassium carbonate was removed by screening, the reaction mass concentrated and 150ml 5% (w/w) brine and 150ml toluene added. The

22/32

organic layer was separated and the aqueous washed twice more with 250ml toluene. The organic layers were combined, washed three times with 15% (w/w) brine and the solvent removed by vacuum distillation to give 17.78g of clear oil, which was determined to be >99% (4R,6S)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4-acetic acid, 1,1-dimethylethylester.

Example 2

Preparation of (5S) tert-butyl 6-acetoxy-5-hydroxy-3-ketohexanoate.

To a stirred 250ml round bottom flask were charged 2.32g (0.0106moles) (5S) tert-butyl 5,6-dihydroxy-3-ketohexanoate, 40ml tetrahydrofuran, 0.98ml (0.0106 moles) vinyl acetate and 0.22g of the supported lipase Chirazyme L2 TM. After 20 minutes the lipase was removed by screening and the volatiles removed by distillation under vacuum, to give 2.96g of a crude oil that was characterised by NMR as (5S) tert-butyl 6-acetoxy-5-hydroxy-3-ketohexanoate.

Example 3

Preparation of (3R,5S) t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate.

Pichia angusta NCYC R230 (deposited under the provisions of the Budapest Treaty on May 18th, 1995) was grown in a Braun Biostat Q multi-fermenter system in the following medium (per litre): glucose 40 g; MgSO₄, 1.2 g; K₂SO₄, 0.21 g; KH₂PO₄, 0.69 g; H₃PO₄ (concentrated), 1 ml; yeast extract (Oxoid), 2 g; FeSO₄.7H₂O, 0.05 g; antifoam (EEA 142 Foammaster), trace elements solution, 1 ml (this solution contained per litre CuSO₄.5H₂O, 0.02 g; MnSO₄.4H₂O, 0.1 g; ZnSO₄.7H₂O, 0.1 g; CaCO₃, 1.8 g.

Each of 4 fermenters were charged with 250 ml of medium and sterilised by autoclaving. The pH was adjusted to 4.5 using 7 molar ammonium hydroxide solution, the temperature was set to 28°C, the air flow set at 300 ml/minute and the agitator speed set to 1200 rpm. Fermenters were inoculated with cells taken from agar plates (2% agar) comprising the same medium as described above except that the glucose concentration was 20 g/litre. Following 22 hours growth in the fermenters the bioreduction reaction was started by the addition of (5S) t-butyl 3-keto-5,6-dihydroxyhexanoate; two of the fermenters were charged with 3.75 ml each and the other two charged with 5 ml each.

The reaction was continued for a further 78 hours until 100% conversion of substrate. During this period the culture was fed with a 50% solution of glucose at a rate of 1-3 grams glucose/litre culture/hour to maintain cell viability and provide a source of reducing power. Reactions were terminated by removal of the cells by centrifugation. To the recovered cell-free supernatant was added sodium chloride to a final concentration of 20% w/v and the mixture extracted three times with an equal volume of acetonitrile. The

pooled acetonitrile extracts were dried with anhydrous sodium sulfate and the solvent removed under reduced pressure in a rotary evaporator (water bath temperature 45°C) to yield a viscous pale yellow oil. The identity of the product from each reaction was confirmed as (3R,5S) t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate and the diastereomeric excess of each of the samples is given in the table below.

experiment	diastereomeric excess (%)
1	99.6
2	99.6
3	99.4
4	99.6

Example 4

Preparation of (3R,5S) t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate.

Pichia angusta NCYC R320 (deposited under the provisions of the Budapest Treaty on May 18th, 1995) was grown in a Braun Biostat Q multi-fermenter system in the following medium (containing, per litre): glucose, 20 g; ammonium sulfate, 10 g; Yeast extract (Oxoid), 2 g; MgSO₄·7H₂O, 1.2 g; KH₂PO₄, 0.69 g; K₂SO₄, 0.21 g; FeSO₄·7H₂O, 0.05 g; H₃PO₄ (concentrated), 1 ml; EEA 142 "foammaster" antifoam, 0.5 ml; trace elements solution, 1 ml (this solution contained per litre Ca(CH₃CO₂)₂, 2.85g; ZnSO₄·7H₂O, 0.1 g; MnSO₄·H₂O 0.075 g CuSO₄·5H₂O, 0.02 g; sulphuric acid (concentrated), 1 ml).

One fermenter was charged with 250 ml medium and sterilised by autoclaving. The pH was adjusted to 5.0 using 2 molar sodium hydroxide solution. The temperature was set to 28°C, the air flow was set to 250 ml minute⁻¹ and the agitator speed set to 1200 rpm. The fermenter was inoculated with 2.5ml of a suspension of cells in sterile deionised water prepared from an agar plate of *Pichia angusta* NCYC R320. Following 17 hours growth the bioreduction was started by the addition of 6.36g 5(S) t-butyl 3-keto-5,6-dihydroxyhexanoate as an aqueous solution. At the same time a glucose feed to the fermenter was started at a rate of 2g glucose L⁻¹ h⁻¹.

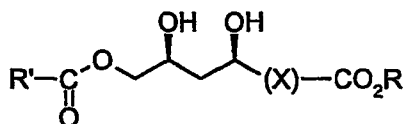
The reaction was continued for a further 78 hours at which point 96% conversion of the substrate had been achieved. Starting material and product were detected by HPLC (Hichrom S5 CN-250A column, temperature 35°C, mobile phase: aqueous TFA (0.1%) : acetonitrile 95:5, flow rate 1 ml min⁻¹, injection volume 5 ml, refractive index detector).

2/3

The reaction was terminated by the removal of cells by centrifuging at 4000 x g for 20 minutes. The pH of the recovered cell-free supernatant was adjusted to 7.5 using 2M NaOH. $\text{MgSO}_4 \cdot 1.6\text{H}_2\text{O}$ (15 % w/v based on anhydrous) was dissolved in the cell-free supernatant and the resulting solution was extracted twice with an equal volume of 2-pentanone. The solvent phases were collected and the solvent removed under reduced pressure in a rotary evaporator at 45°C yielding an orange viscous oil. This was re-dissolved in 50 ml dry, distilled 2-pentanone and again the solvent was removed by rotary evaporation to afford t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate (5.08 g, 80 % isolated yield). Diastereomeric excess was determined as follows; a sample of t-butyl 3,5,6-trihydroxyhexanoate (30 mg) was derivatised by reaction for at least 10 minutes at room temperature in an excess of trifluoroacetic anhydride, excess anhydride was removed under a stream of dry nitrogen and the residual oil diluted with dichloromethane (1 ml). The sample was analysed using a Chiralcel Dex CB column (25 metre) at a temperature of 140°C (isothermal). The diastereomers eluted at 14.4 minutes (3R,5S diastereomer) and 15.7 minutes (3S,5S diastereomer). The diastereomeric excess of the sample was found by this method to be 99.7%.

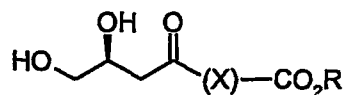
CLAIMS

1. A process for the preparation of a compound of formula (1)



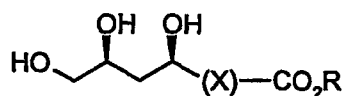
Formula 1

which comprises either a) the stereoselective reduction of a compound of formula (2)



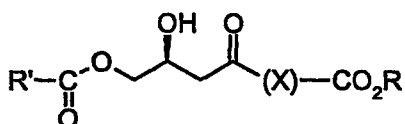
Formula 2

to produce a compound of formula (3), and



Formula 3

- b) Esterification of the compound of formula (3) in the presence of a compound of formula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ and a lipase or hydrolase enzyme thereby to form the compound of formula (1); or
- c) Esterification of a compound of formula (2) in the presence of a compound of formula $\text{R}''-\text{O}-\text{COR}'$ and a lipase or hydrolase enzyme thereby to form the compound of formula (4), and



Formula 4

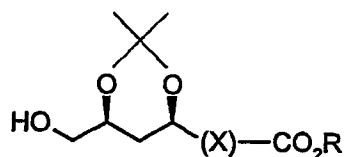
- d) the stereoselective reduction of a compound of formula (4) to produce a compound of formula (1)

wherein

X represents an optionally substituted hydrocarbyl linking group

R and R" each independently represent an optionally substituted hydrocarbyl group, and R' represents an optionally substituted hydrocarbyl, preferably an optionally substituted alkyl group.

- 5 2. A process according to claim 1, wherein X represents a group of formula -CH₂-.
3. A process according to either preceding claim, wherein R" represents a vinyl or isopropenyl group.
- 10 4. A process according to any preceding claim, wherein R' represents a substituted or unsubstituted C₁₋₆ alkyl group.
5. A process according to claim 4, wherein R' represents a methyl group.
- 15 6. A process according to any preceding claim, wherein the compounds of Formulae (2) or (4) are reduced by contact with an organism possessing the properties of a microorganism selected from *Beauveria*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces* or *Torulaspora* genera or an enzyme extracted therefrom.
- 20 7. A process according to claim 6, wherein the compounds of formulae (2) or (4) are reduced by contact with an organism selected from the group consisting of *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Pichia trehalophila*, *Kluyveromyces drosopliarum* and *Torulospira hansenii*, or an enzyme extracted therefrom.
- 25 8. A process according to either of claims 6 or 7, wherein whole cells are employed.
9. A process according to any one of claims 6, 7 or 8, wherein the compounds of formulae (2) or (4) are reduced at a pH of from 4 to 5.
- 30 10. A process according to any preceding claim, wherein the compounds of formulae (2) or (3) are esterified in the presence of an enzyme selected from the group consisting of Porcine pancreatic lipase, *Candida cylindracea* lipase, *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Candida antarctica* fraction B and lipase from *Humicola lanuginosa*.
- 35 11. A process according to any preceding claim, wherein the compound of formula R"-O-COR' is vinyl acetate.
12. A process for the preparation of a compound of formula (5)



Formula 5

which comprises:

a) preparing a compound of formula (1) by a process according to any preceding claim; b)
 5 reacting the compound of formula (1) with 2,2-dimethoxypropane to form an acetonide;
 and

c) removing the group R'-(C=O)-;

wherein

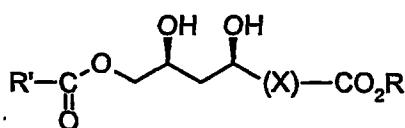
X represents an optionally substituted hydrocarbyl linking group

10 R represents an optionally substituted hydrocarbyl group, and

R' represents an optionally substituted hydrocarbyl, preferably an optionally substituted
 alkyl group.

13. A process according to claim 12, wherein the R'-(C=O)- is removed by treatment
 15 with a basic, alcoholic solution.

14. A compound of formula (1):

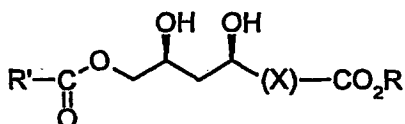


Formula 1

20 wherein R' is CH₃, R is optionally substituted hydrocarbyl, X is -(CH₂)_n- and n is 1 to 4.

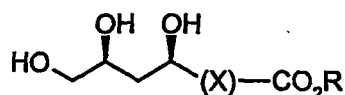
15. A compound according to claim 14, wherein R is t-butyl and X is -CH₂-.

25 16. A process for the preparation of a compound of formula (1)



Formula 1

which comprises esterification of a compound of formula (3)



Formula 3

in the presence of a compound of formula $\text{R}''\text{-O-COR}'$ and a lipase or hydrolase enzyme thereby to form the compound of formula (1);

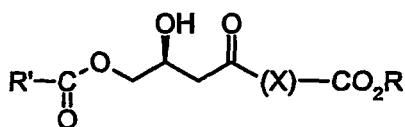
wherein

X represents an optionally substituted hydrocarbyl linking group

R and R'' each independently represent an optionally substituted hydrocarbyl group, and

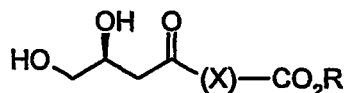
R' represents an optionally substituted hydrocarbyl, preferably an optionally substituted alkyl group.

17. A process for the preparation of a compound of formula (4)



Formula 4

which comprises esterification of a compound of formula (2)



Formula 2

in the presence of a compound of formula $\text{R}''\text{-O-COR}'$ and a lipase or hydrolase enzyme thereby to form the compound of formula (4);

wherein

X represents an optionally substituted hydrocarbyl linking group

R and R'' each independently represent an optionally substituted hydrocarbyl group, and

R' represents an optionally substituted hydrocarbyl, preferably an optionally substituted alkyl group.

18. A process according to either of claims 16 or 17, wherein R' is CH_3 , R is t-butyl and X is $-\text{CH}_2-$.

19. A process according to any one of claims 16, 17 or 18, wherein R" is a vinyl or isopropenyl group.

5 20. A process according to any one of claims 16 to 19, wherein the enzyme is selected from the group consisting of Porcine pancreatic lipase, *Candida cylindracea* lipase, *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Candida antarctica* fraction B and lipase from *Humicola lanuginosa*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 01/01915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/62 C12P17/06 C07C69/675 //C12N9/20,C07D319/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C07C C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, EPO-Internal, BIOSIS, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 569 998 A (SQUIBB & SONS INC) 18 November 1993 (1993-11-18) the whole document	
A	PATEL R N ET AL: "ENANTIOSELECTIVE MICROBIAL REDUCTION OF 3,5-DIOXO-6-(BENZYLOXY) HEXANOIC ACID, ETHYL ESTER" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 15, no. 12, 1993, pages 1014-1021, XP000651790 ISSN: 0141-0229 the whole document	
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2001

Date of mailing of the international search report

22/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/GB 01/01915

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 00968 A (ZENECA LTD ;REEVE CHRISTOPHER DAVID (GB)) 9 January 1997 (1997-01-09) the whole document	
A	EP 0 579 370 A (CHISSO CORP) 19 January 1994 (1994-01-19) the whole document	
A	US 5 278 313 A (THOTTATHIL JOHN K ET AL) 11 January 1994 (1994-01-11) cited in the application the whole document	
A	EP 0 606 899 A (DAICEL CHEM) 20 July 1994 (1994-07-20) the whole document	
A	EP 0 737 751 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 16 October 1996 (1996-10-16) the whole document	
A	EP 0 796 914 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 September 1997 (1997-09-24) the whole document	
A	PETERS J ET AL: "Studies on the distribution and regulation of microbial keto ester reductases" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 38, December 1992 (1992-12), pages 334-340, XP002134909 ISSN: 0175-7598 the whole document	
P,A	WO 00 36134 A (HUMMEL WERNER ;MUELLER MICHAEL (DE); WOLBERG MICHAEL (DE); KERNFOR) 22 June 2000 (2000-06-22) the whole document	
P,A	WO 01 04336 A (WANDREY CHRISTIAN ;HUMMEL WERNER (DE); MUELLER MICHAEL (DE); WOLBE) 18 January 2001 (2001-01-18) the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 01/01915

27
31

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0569998 A	18-11-1993	US 5324662 A AT 197963 T CA 2094191 A DE 69329719 D DE 69329719 T DK 569998 T ES 2152234 T JP 6030783 A PT 569998 T	28-06-1994 15-12-2000 16-11-1993 11-01-2001 05-07-2001 08-01-2001 01-02-2001 08-02-1994 30-03-2001
WO 9700968 A	09-01-1997	AU 6230696 A CA 2221800 A CZ 9704129 A EP 0833938 A JP 11507204 T US 6001615 A	22-01-1997 09-01-1997 18-03-1998 08-04-1998 29-06-1999 14-12-1999
EP 0579370 A	19-01-1994	DE 69329221 D EP 0909757 A JP 6054699 A US 5329018 A	21-09-2000 21-04-1999 01-03-1994 12-07-1994
US 5278313 A	11-01-1994	US 5457227 A US 5594153 A	10-10-1995 14-01-1997
EP 0606899 A	20-07-1994	JP 3155107 B JP 6209782 A CA 2113240 A DE 69422064 D DE 69422064 T US 5559030 A	09-04-2001 02-08-1994 13-07-1994 20-01-2000 25-05-2000 24-09-1996
EP 0737751 A	16-10-1996	JP 8336393 A US 5700670 A	24-12-1996 23-12-1997
EP 0796914 A	24-09-1997	DE 19610984 A JP 10028590 A US 6225099 B US 6037158 A	25-09-1997 03-02-1998 01-05-2001 14-03-2000
WO 0036134 A	22-06-2000	DE 19857302 A	29-06-2000
WO 0104336 A	18-01-2001	DE 19937825 A	18-01-2001

PATENT COOPERATION TREATY

cc 5/12
38

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

REVELL, Christopher
Avecia Limited
Intellectual Property Group
Hexagon House, P.O. Box 42
Manchester M9 8ZS
GRANDE BRETAGNE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

15/01/2002

Applicant's or agent's file reference

SMC 60423/WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/GB 01/01915

International filing date (day/month/year)

01/05/2001

Priority date (day/month/year)

09/05/2000

Applicant

AVECIA LIMITED et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

DATE	INITIALS
17/1/02	KS
DATE ENTERED INTO XEN-PAT	DATE ENTERED INTO XEN-PAT
YES	NO
MINISTER CREATED	MINISTER CREATED
OR AT JOURNEY	OR AT JOURNEY
TO BE VERIFIED	TO BE VERIFIED
XEN-PAT ENTRY VERIFIED	XEN-PAT ENTRY VERIFIED

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Authorized officer

VELEZ M

Tel. (+49-89) 2399 2828



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference SMC 60423/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/GB 01/ 01915	International filing date (<i>day/month/year</i>) 01/05/2001	Priority date (<i>day/month/year</i>) 09/05/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P7/62		
Applicant AVECIA LIMITED et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This **REPORT** consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:
- I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19/11/2001	Date of completion of this report 10/01/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer COUCKE A O M Tel. (+49-89) 2399 2828



I. Basis of report

1. The basis of international preliminary examination report is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

2. The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been and will not be the subject of the international preliminary examination (Article 34 (4) (a) (i) (ii) PCT; see also international search report) in respect of:

2.1 Applications having an unnecessary plurality of independent claims (generally not more than 1 independent claim in the same category is necessary; Article 6 PCT);

2.2 unsearched subject-matter (Article 17 (2) (a), Rule 66.1 (e) PCT).

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

3. To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out (Article 35 (2) and (3) (b) and Rule 70.7 and 70.8 (ii) PCT):

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as claimed in the independent claims meets the criteria mentioned in Article 33 (1) PCT, i.e. it appears to be novel, to involve an inventive step and to be industrially applicable.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICACION
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(X)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(X)
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	(X)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ☒ INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:

Edwar Novillo
 Fecha: 07-11-2002