

OK



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

07-15790

TITULO: BIOTRANSFORMACION ENETIOSELACTIVA PARA LA

PREPARACIÓN DE INTERMEDIOS DE INHIBIDORES DE LA PROTEINA

TIROSINA QUINASA

SOLICITANTE: PFIZER INC.

CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K31/216
A61P35/00

DIRECCIÓN: 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A.

APODERADO: CARLOS OLARTE

BOGOTÁ, 17 DE FEBRERO, 2007

SS

F.N. 26-03-2007
Publicación

07114

2

OlarteRaisbeck



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-015790- -00000-0000
Fec 2007-02-16 16 33 17 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEIYI
Eve 379 FASENACIONALI
Act411. PRESENTACION .Folios 181

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**S LICITANTE
(71)**

Nombre: PFIZER INC

Dirección: 235 East 42nd Street, New York, NY
10017 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/002839

Fecha Agosto 15, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/021885

Fecha Marzo 2, 2006

6

Título (54) BIOTRANSFORMACIÓN ENETIOSELECTIVA PARA LA PREPARACIÓN DE
INTERMEDIOS DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA TIROSINA QUINASA

Clasificación Internacional (51) C12P 7/22; C12P 41/00; C07C 33/46 // A61K31/216
A61P35/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Agosto 26, 2004

(31) Número de Solicitud

60/605.118

9

Comprobante de pago No. 07-13.367

Fecha Febrero 13, 2007

0

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver Expediente 06-051.757. Adjunto Copia Simple

☒

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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☒

Traducción del examen preliminar internacional 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 12 x 12.

☐

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.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

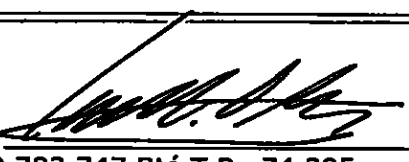
1

FIGURA CARACTERÍSTICA:

2

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

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

LISTA DE INVENTORES PCT/IB2005/002839

1. PEI-PEI KUNG
10770 Science Center Drive,
San Diego, California 92121
Estados Unidos de América
Nacionalidad Estadounidense
- 2 CARLOS ALBERTO MARTINEZ
10770 Science Center Drive,
San Diego, California 92121
Estados Unidos de América
Nacionalidad Colombiana
3. JUNHUA TAO
10770 Science Center Drive,
San Diego, California 92121
Estados Unidos de América
Nacionalidad: China

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-015790- -00000-0000
Fec. 2007-02-16 16 33 17 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEIYII
Eve 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 181

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

LIBRO OFICIAL DE CAJA : 07 - 13,367
FECHA : FEBRERO 13 DE 2007

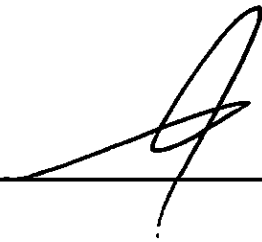
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	57477376	13/02/2007	1,446,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

PFIZER INC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio
de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth
Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía
funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con
sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham
en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos
exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos
exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe
presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C

Marlén Neira C
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No 2117 del 7 de 2003

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 5A-55 PISO 10
BOGOTÁ, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 636-6200
FAX +57-1 636-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions

Poder

El suscrito,

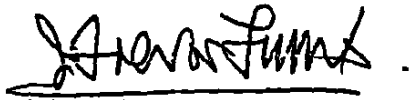
Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

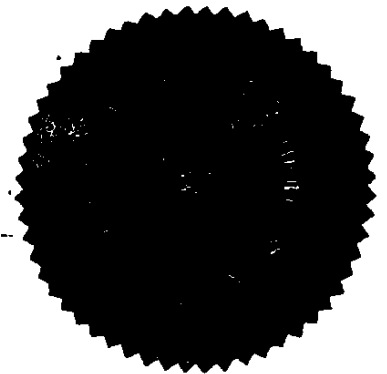
por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistur y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones

Signature/Firma:



Date/Fecha: July 14, 2003

City/Country/Ciudad,País: New York, USA



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 84-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1 That *J. Trevor Lumb*
J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in
New York, USA New York
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant General Patent Counsel of Pfizer Inc.

3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4 That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5 The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s)

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica.

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

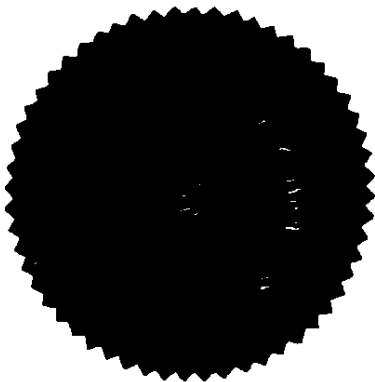
EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey

This *14th*

Day Of *July*

2003

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNBY ENGLAND AND FREEMAN



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

- 1 Country United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

- 2 Has been signed by K Greenwood
a été signé par

- 3 Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de

- 4 Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

- 5 at London/à Londres
Certified/Atteste
6 the/le 17 July 2003

- 7 by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth

- 8 Number/sous No **G210434**

- 9 Stamp
timbre.
10 Signature R. Bawden



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country

Sébase que Yo, STEPHEN DAVID FINN, de 31 Amersham Hill Drive
Hight Wycombe Buckinghamshire Reino Unido un Notario Público
debidamente autorizado.

CERTIFICO UNICAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXADO AL
PRESENTE LLAMADO:

CESION, firmada por PEI PEI KUNG Y CARLOS ALBERTO MARTINEZ Y
JUNHUA TAO

Ha sido presentado ante mí por los Servicios Consulares de Blair en
nombre de Pfizer con base en un documento original con firmas
debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 31 Amersham Hill Drive según lo dicho
anteriormente, el día de hoy 8 de diciembre de 2006.

[Firmado y sellado]

STEPHEN FINN
Notario Público

9.

Apostilla

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Stephen David Finn
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

- | | |
|--|---|
| 5. en Londres | 6. el 11 de diciembre de 2006 |
| 7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros | |
| 8. No. H227048 | |
| 9. Sello / Estampilla
[Sellado] | 10. Firma: Christopher Jones
[Firmado] (por el Secretario de Estado) |

CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por PFIZER INC, sociedad constituida en virtud de las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, cuya dirección postal completa es 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, Estados Unidos de América, por el presente vendemos y traspasamos a la citada PFIZER INC, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en BIOTRANSFORMACION ENANTIOSELECTIVA PARA LA PREPARACION DE INTERMEDIOS DE INHIBIDORES DE LA PROTEINA TIROSINA QUINASA, en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada PFIZER INC., de conformidad con esta Cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

San Diego, CA, 09 de mayo de 2005, (Fdo) Pei-Pei KUNG

Lugar fecha y firma - Pei-Pei KUNG

San Diego, CA, 06 de mayo de 2005, (Fdo) Carlos Alberto MARTINEZ

Lugar fecha y firma - Carlos Alberto MARTINEZ

San Diego, CA, 06 de mayo de 2005, (Fdo) Junhua TAO

Lugar fecha y firma - Junhua TAO

BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive
High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary
Public

CERTIFY ONLY that the document annexed hereto, namely:

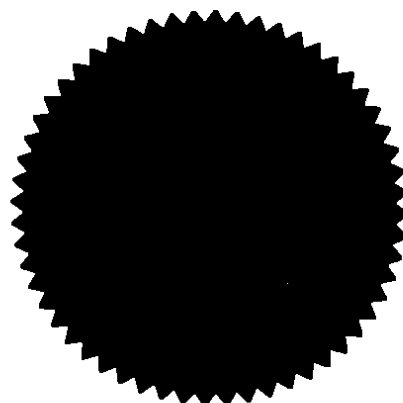
**ASSIGNMENT signed by PEI PEI KUNG and CARLOS ALBERTO
MARTINEZ and JUNHUA TAO**

has been presented before me by Blair Consular Services on behalf of Pfizer
on the basis that it is an authentic duly signed original document

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 8th December
2006



**Stephen Finn
Notary Public**



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by Stephen David Finn
a été signé par

3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
6. the/le 11 December 2006

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H227048**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: Christopher Jones





For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER INC.**, a corporation organized under the laws of the State of Delaware, United States of America whose full post office address is 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **ENANTIOSELECTIVE BIOTRANSFORMATION FOR PREPARATION OF PROTEIN TYROSINE KINASE INHIBITOR INTERMEDIATES** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

San Diego, CA May 9th, 2005

Place, date and signature - Pei-Pei KUNG

San Diego CA May 6th 2005

Place, date and signature - Carlos Alberto MARTINEZ

San Diego CA May 6th 2005

Place, date and signature - Junhua TAO

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 March 2006 (02.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/021885 A1

(51) International Patent Classification:
C12P 7/22 (2006 01) C12P 41/00 (2006.01)
C07C 33/46 (2006.01)

(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; Pfizer Inc., 201
Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US)

(21) International Application Number:
PCT/IB2005/002839

(22) International Filing Date: 15 August 2005 (15 08.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/605,118 26 August 2004 (26.08 2004) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
INC. [US/US], 235 East 42nd Street, New York, NY 10017
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KUNG, Pei-Pei
[US/US]; Pfizer Global Research and Development,
10770 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US)
MARTINEZ, Carlos, Alberto [CO/US]; Pfizer Global
Research and Development, 10770 Science Center Drive,
San Diego, CA 92121 (US) TAO, Junhua [CN/US],
Pfizer Global Research and Development, 10770 Science
Center Drive, San Diego, CA 92121 (US)

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: ENANTIOSELECTIVE BIOTRANSFORMATION FOR PREPARATION OF PROTEIN TYROSINE KINASE IN-
HIBITOR INTERMEDIATES

(57) Abstract: The invention relates to biocatalytic methods for preparing enantiomerically pure stereoisomers of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. Disclosed are methods of preparation of the desired (S)-enantiomer, which methods are based on a combination of enzymatic resolution, chemical esterification and chemical hydrolysis with inversion of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters or stereoselective bio-reduction of 2,6-dichloro-3-fluoro-acetophenone with a biocatalyst such as an enzyme or a microorganism. The chiral (S)-enantiomer can be used in the synthesis of certain enantiomerically enriched, ether linked 2-aminopyridine compounds that potently inhibit auto-phosphorylation of human hepatocyte growth factor receptor.



WO 2006/021885 A1

14

-1-

5 **ENANTIOSELECTIVE BIOTRANSFORMATION FOR PREPARATION OF PROTEIN TYROSINE
KINASE INHIBITOR INTERMEDIATES**

Field of the Invention

10 This invention relates to methods for preparing enantiomerically pure stereoisomers of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol that are useful intermediates in the synthesis of enantiomerically enriched, ether linked 2-aminopyridine analogues that potently inhibit auto-phosphorylation of human hepatocyte growth factor receptor and therefore may be useful in the treatment of cancer and other hyperproliferative disorders.

Background of the Invention

15 Strategies to obtain a single enantiomer of a compound have become important in drug discovery because often one enantiomer is an effective drug while the other enantiomer has undesirable biological activity. Ideally, an asymmetric synthesis is designed to produce only the desired enantiomer. Unfortunately, more often than not, an asymmetric synthesis cannot be designed or is prohibitively expensive.

20 Although 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone was enantioselectively reduced to (1*R*)-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol with an enantiomeric purity of 96% enantiomeric excess (ee) using a reducing agent prepared from sodium borohydride, trimethylsilyl chloride and a catalytic amount of (*S*)- α,α -diphenylpyrrolidinemethanol (Jiang et al. *Tetrahedron Lett.*, 2000, vol. 41, pp. 10281-10283), there is no available chemical synthesis for producing (1*S*)-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol, which is an
25 intermediate in the synthesis of certain enantiomerically enriched, ether linked 2-aminopyridine analogues that potently inhibit auto-phosphorylation of human hepatocyte growth factor receptor (HGFR or c-MET). Examples of c-MET (HGFR) inhibitors, their synthesis and use, can be found in U.S. Patent Application Serial No. 10/786,610, entitled "Aminoheteroaryl Compounds as Protein Kinase Inhibitors", filed February 26, 2004, and corresponding international application PCT/US2004/005495 of the same title, filed
30 February 26, 2004, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties.

 Our attempts to prepare (1*S*)-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol with adequate enantiomeric purity by chiral reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone using different chemical reagents, for example, (*R*)-2-methyl-CBS-oxazaborolidine/BH₃-dimethylsulfide complex (BMS) (*J. Am. Chem. Soc.* 1987, vol. 109, pp. 7925), sodium borohydride, trimethylsilyl chloride and a catalytic amount of (*S*)- α,α -diphenylpyrrolidinemethanol (Jiang et al. *Tetrahedron Lett.*, 2000, vol. 41, pp. 10281-10283);
35 oxazaborolidine/BH₃-dimethylsulfide complex (BMS) (*J. Org. Chem.* 1993, vol. 58, pp. 2880); and (-)-*B*-chlorodisopinocampheylborane (DIP-Cl) (*Tetrahedron Lett.* 1997, vol. 38, pp. 2841), were unsuccessful.

 It is known that enantiomerically pure alcohols can be produced by stereoselective reduction using biocatalysts such as enzymes or microorganisms. For example, phenylacetaldehyde reductase
40 from *Corynebacterium* strain ST-10 has a broad substrate range and reduces various prochiral aromatic ketones and β -ketoesters to yield optically active secondary alcohols with an enantiomeric purity of more than 98% enantiomeric excess (ee). Itoh et al., *Eur. J. Biochem.*, 2002, v. 269, pp. 2394-2402. According to a review on recent developments in the asymmetric reduction of ketones with biocatalysts, for example, for the reduction of ethyl 2-methyl-3-oxobutanoate, *Klebsiella pneumoniae* IFO 3319 out of 450 bacterial

15

-2-

5 strains was found to give the corresponding (2R,3S)-hydroxy ester with >99% ee. K. Nakamura et al. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659-2681. U.S. Patent No. 5,310,666 discloses a *Rhodotorula rubra* strain, which reduces pentoxifylline to 100% to give the S-alcohol. U.S. Patent No. 6,451,587 provides microbial asymmetric reduction processes for preparing the alcohol (R)-2-chloro-1-[6-(2,5-dimethyl-pyrrol-1-yl)-pyridin-3-yl]-ethanol from the ketone 2-chloro-1-[6-(2,5-dimethyl-pyrrol-1-yl)-pyridin-3-yl]-ethanone. U.S. Patent Nos. 6,642,387 and 6,515,134 disclose preparation of certain optically active hydroxyethyl pyridine derivatives using microbial reduction. U.S. Patent No. 5,391,495 discloses the stereoselective reduction of certain keto-containing sulfonamide compounds to form the corresponding hydroxyl group-containing compounds utilizing a microorganism or an enzyme capable of catalyzing the reduction. Whole cell biocatalysts were used for reducing 3,4-dichlorophenacylchloride to give the (R)- or (S)-chlorohydrine in high yields and good to high ee. Barbieri et al. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, vol. 10, pp. 3931-3937. Nonracemic 1-phenylethylalcohol of R and S configuration and of high enantiomeric purity was obtained by bio-reduction of acetophenone in nonaqueous environment – anhydrous hexane. Zymanczyk-Duda et al., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2004, vol. 34, pp. 578-582. WO 02/077258 describes preparation of certain (S)-1-(2,4-substituted-phenyl)ethanol derivatives by microbial reduction. However, the stereoselective microbial and enzymatic reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone has been unknown.

15 Alternatively, the mixture of enantiomers can be separated. However, mixtures of enantiomers are difficult, and often impossible, to separate because the physical properties of the enantiomers are identical towards achiral substances and can only be distinguished by their behavior towards other chiral substances. Chromatographic methods using a chiral solid phase have been utilized to separate enantiomeric mixtures, but chiral solid supports are expensive and, typically, the resolution is poor.

25 An alternative method of separating enantiomeric mixtures is by reacting them with a chiral reagent. In this procedure, the mixture of enantiomers react with the chiral reagent to form diastereomers which are distinguishable from each other on the basis of their properties towards achiral substances, and therefore, can be separated by techniques such as recrystallization or chromatography. This process is time consuming and results in loss of yield because it requires two additional reaction steps (i.e., one reaction to add the chiral auxiliary to the enantiomers and another reaction to remove it after the diastereomers have been separated).

35 In some instances, a chiral reagent will react much faster with one enantiomer than with the other enantiomer in the enantiomeric mixture. In this case, the enantiomer which reacts faster can be removed before the other enantiomer is formed. This method also necessitates two additional reaction steps to add the chiral auxiliary and to remove it after the separation.

40 The methods described above cannot always be applied successfully to a particular system, and when they can be applied, they are often expensive, time consuming and result in loss of yield. Therefore, the need exists for new methods of obtaining a single enantiomer from an enantiomeric mixture.

It is known that chiral resolution of compounds can be achieved by using enzymes, such as esterases, lipases, and proteases or microorganisms. For example, U.S. Patent No. 6,703,396 describes chiral resolution of a racemic mixture of nucleoside enantiomers based on enzymatic hydrolysis of C5'-

-3-

5 nucleoside esters. U.S. Patent No. 6,638,758 describes the enzymatic resolution of racemic esters of lactams using a biocatalyst, such as an enzyme or a microorganism. U.S. Patent No. 5,928,933 discloses an enzyme with an enantiomeric excess value of 95% for N-(alkoxycarbonyl)-4-keto-D,L-proline alkyl esters as a result of extensive experiments for reaction specificity of 44 enzymes, including proteases, lipases and esterases. Preparation of certain optically active secondary alcohols by combination of
 10 enzymatic hydrolysis and chemical transformation is described, for example, in Danda et al., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701-8716; Vantinen et al. *Tetrahedron:Asymmetry*, 1995, vol. 6, pp. 1779-1786; and Liu et al., *Chirality*, 2002, vol. 14, pp. 25-27.

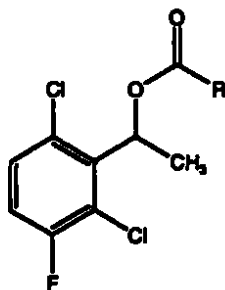
Although biocatalysts are very useful for the separation of enantiomeric mixtures, because the selectivity for enantiomers and the optical purity of products may vary depending on the choice of an
 15 enzyme or microorganism and the chemical structures of substrates, intensive efforts are required to find combinations of biocatalysts suitable for substrates. Especially, nowhere is found a method for separating enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters using a biocatalyst.

Summary of the Invention

20 Methods are provided for preparing enantiomerically pure stereoisomers of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

In one embodiment, the present invention provides (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol that is at least 70 % free of (1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol; preferably at least 80 % free of (1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol; more preferably at least 90 % free of (1R)-1-(2,6-dichloro-3-
 25 fluorophenyl)ethanol; and most preferably at least 95 % free of (1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

In another embodiment, the present invention provides a method of separating enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters of formula (I):



30 wherein R is hydrogen, C₁-C₂₀-alkyl, C₃-C₆-cycloalkyl, C₆-C₁₄-aryl, C₇-C₁₅-arylalkyl, C₁-C₂₀-alkoxy, or C₁-C₂₀-alkylamino, wherein said hydrocarbon radicals can optionally be monosubstituted or polysubstituted with hydroxyl, formyl, oxy, C₁-C₆-alkoxy, carboxy, mercapto, sulpho, amino, C₁-C₆-alkylamino, nitro or halogen,

the method comprising the steps of:

35 contacting the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters of formula (I) with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein only one enantiomer is selectively hydrolyzed to give an optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-

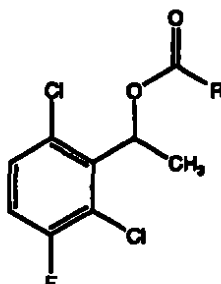
4

5 fluorophenyl)ethanol and an unreacted optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester, and

separating the optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol from the unreacted optically active 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester.

10 In yet another embodiment, the present invention provides a method for preparing (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol comprising the steps of:

contacting a mixture of enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters of formula (I):



15 wherein R is hydrogen, C₁-C₂₀-alkyl, C₃-C₈-cycloalkyl, C₆-C₁₄-aryl, C₇-C₁₅-arylalkyl, C₁-C₂₀-alkoxy or C₁-C₂₀-alkylamino, wherein said hydrocarbon radicals can optionally be monosubstituted or polysubstituted with hydroxyl, formyl, oxy, C₁-C₈-alkoxy, carboxy, mercapto, sulpho, amino, C₁-C₈-alkylamino, nitro or halogen,

20 with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein only (*R*)-enantiomer is selectively hydrolyzed to give a mixture of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and a (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester; and

converting the mixture of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester to (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

Other specific embodiments of this method include those wherein the converting step comprises:

25 a) reacting (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol in the mixture of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester with an organic sulfonyl halide in an aprotic solvent to form a mixture of an organic sulfonic acid ester of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester;

30 b) further reacting the organic sulfonic acid ester of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol in the mixture of the organic sulfonic acid ester of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester with an alkali metal salt of an aliphatic carboxylic acid in an aprotic solvent to form a mixture of an aliphatic carboxylic acid ester of (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester; and

35 c) transforming the mixture of the aliphatic carboxylic acid ester of (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester into (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

Yet other specific embodiments of the method include those wherein:

R is methyl;

the biocatalyst is pig liver esterase;

-5-

5 in the reacting step a) the organic sulfonyl halide is methanesulfonyl chloride and the aprotic solvent is pyridine;

In the reacting step b) the alkali metal salt of the aliphatic carboxylic acid is potassium acetate and the aprotic solvent is dimethylformamide;

10 the transforming step c) is solvolysis in an alcoholic or aqueous solvent in the presence of a basic substance.

Yet other specific embodiments of this method include those comprising the step of selecting the biocatalyst through a high throughput screening process prior to the contacting step.

15 In another embodiment, the present invention provides a method for preparing an optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol comprising the step of reducing 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone by a biocatalyst in an enantioselective manner to give the optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

Other specific embodiments of the method include those comprising the step of selecting the biocatalyst through a high throughput screening process prior to the contacting step.

Other specific embodiments of the method include those wherein:

20 the biocatalyst is horse liver alcohol dehydrogenase or a microorganism of the genus *Rhodotorula*.

Definitions

The term "biocatalyst," as used herein, refers to an enzyme or a microorganism.

25 The activities of the enzymes used in this invention are expressed in "units". Units are defined as the rate of hydrolysis of p-nitrophenyl propionate as expressed in $\mu\text{mol/min}$ at room temperature.

The term "biotransformation," as used herein, refers to conversion of a substance into other compounds employing an enzyme or microorganism.

30 The term "bioreduction," as used herein, refers to a process in which electrons are added to an atom or ion (as by adding hydrogen or removing oxygen) employing an enzyme or microorganism; which process always occurs accompanied by oxidation of the reducing agent.

35 The term "co-factor" or "co-enzyme" means a substance, which activates an enzyme or is necessary for normal activity of an enzyme. The term "co-factor" or "co-enzyme" as used herein, refers to any suitable co-factor or co-enzyme comprising the enzyme reduction system such as, for example, NADH, NADPH, FADH, FMNH, and/or PQQ or any suitable co-factor or co-enzyme, which occurs with the enzyme in the microorganism.

The term "enzyme" includes those enzymes which are known or otherwise obtainable by those skilled in the relevant art and able to accomplish the stereoselective reactions disclosed in the present invention.

40 The term "enzyme reduction system" means a suitable oxidoreductase enzyme and the reduced form of a co-factor for the oxidoreductase enzyme. The enzyme comprising the enzyme reduction system may be in either free or immobilized form, e.g., in a column or attached to a bead.

-6-

5 The term "enzymatic resolution," "enzymatic process", "enzymatic method" or "enzymatic reaction" denotes a resolution, process, method or reaction of the present invention employing an enzyme or microorganism.

The term "resolution" denotes partial, as well as, preferably, complete separation of the enantiomers of a racemic form.

10 The term "stereoselective hydrolysis" refers to the preferential hydrolysis of one enantiomer relative to another.

The term "mixture" as used herein in relation to enantiomeric compounds, denotes mixtures having equal (racemic) or nonequal amounts of enantiomers.

15 The term "enantiomeric excess(ee)" is related to the older term "optical purity". In a mixture of a pure enantiomer (S or R) and a racemate, enantiomeric excess is the percent excess of the enantiomer over the racemate. Enantiomeric excess ("ee") can be expressed in the following Equation 1, for example:

Equation 1

$$ee = \frac{[S]-[R]}{[S]+[R]}$$

[S] = concentration of S enantiomer

[R] = concentration of R enantiomer

20

The term " enantioselectivity value " or "E value" denotes the ratio of specificity constants for each enantiomer of the racemate (K_{cat}/K_m) defined below. The E value can be interpreted as the number of times the enzyme is more reactive towards one enantiomer relative to the other (for example, an E value of 50 meaning one enantiomer reacts approximately 50 times faster than the other).

25 In order to determine the enantioselectivity of the biocatalysts towards a pure enantiomer (S or R), the enantioselectivity value (E) needs to be obtained (Equation 2).

Equation 2

$$E = \frac{K_{catS}/K_S}{K_{catR}/K_R} = \frac{\ln [1-c(1+ee_p)]}{\ln [1-c(1-ee_p)]} = \frac{\ln [1-c(1-ee_p)]}{\ln [1-c(1+ee_s)]}$$

K_{catS} = first-order enzyme rate constant for enantiomer S

K_S = Michaelis constant

c = extent of conversion

ee_p = enantiomeric excess for product

ee_s = enantiomeric excess for substrate

30 For example, for stereoselective hydrolysis of esters by biocatalysts, a program (Ee2 software-University of Graz) can accurately calculate the E value if the enantiomeric excess (ee) of either the alcohol or the ester at one particular enzymatic conversion are known. The ee value can be obtained, for example, from Equation 1. The [S] and [R] data can be obtained, for example, by HPLC.

The term "HPLC" means high pressure liquid chromatography.

The term "RP-HPLC" means reverse phase HPLC.

35 The term "PLE" means pig liver esterase.

-7-

5 The term "microbial reduction" means the stereoselective reduction as accomplished by the enzyme reduction system, the microbial reductase comprising the enzyme reduction system, the intact microorganism, or any preparation thereof, and the like.

10 The term "microorganism" includes any intact microorganism or preparation therefrom, including, for example, a broken cell preparation of the microorganism; a dehydrated preparation of the microorganism, e.g., an acetone powder enzymatic preparation; microorganism washed free of, e.g., fermentation medium, culture broth, and the like; microorganism immobilized, e.g., in a column, attached to beads, and the like.

15 As used herein, the terms "optically pure," "enantiomerically pure," "pure enantiomer," and "optically pure enantiomer" mean a composition that comprises one enantiomer of a compound and is substantially free of the opposite enantiomer of the compound. A typical optically pure compound comprises greater than about 80% by weight of one enantiomer of the compound and less than about 20% by weight of the opposite enantiomer of the compound, more preferably greater than about 90% by weight of one enantiomer of the compound and less than about 10% by weight of the opposite enantiomer of the compound, even more preferably greater than about 95% by weight of one enantiomer of the compound and less than about 5% by weight of the opposite enantiomer of the compound, and most preferably greater than about 97% by weight of one enantiomer of the compound and less than about 3% by weight of the opposite enantiomer of the compound.

25 The term "suitable mutants" include those microorganisms which are known or otherwise obtainable by those skilled in the relevant art and able, despite such mutation, to accomplish the stereoselective reactions disclosed in the present invention.

 The term "halo" or "halogen", as used herein, unless otherwise indicated, means fluoro, chloro, bromo or iodo. Preferred halo groups are fluoro, chloro and bromo.

 The term "alkyl", as used herein, unless otherwise indicated, includes saturated monovalent hydrocarbon radicals having straight or branched moieties.

30 The term "alkoxy", as used herein, unless otherwise indicated, includes O-alkyl groups wherein alkyl is as defined above.

 The term "Me" means methyl, "Et" means ethyl, and "Ac" means acetyl.

35 The term "cycloalkyl", as used herein, unless otherwise indicated refers to a non-aromatic, saturated or partially saturated, monocyclic or fused, spiro or unfused bicyclic or tricyclic hydrocarbon referred to herein containing a total of from 3 to 10 carbon atoms, preferably 5-8 ring carbon atoms. Exemplary cycloalkyls include monocyclic rings having from 3-7, preferably 3-6, carbon atoms, such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl and the like.

40 The term "aryl", as used herein, unless otherwise indicated, includes an organic radical derived from an aromatic hydrocarbon by removal of one hydrogen, such as phenyl or naphthyl.

Detailed Description of the Invention

 The invention relates to biocatalytic methods for preparing enantiomerically pure stereoisomers of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. Disclosed are methods of preparation of the desired (S)-enantiomer, which methods are based on a combination of enzymatic resolution, chemical esterification

-8-

- 5 and chemical hydrolysis with inversion of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters or stereoselective bio-reduction of 2,6-dichloro-3-fluoro-acetophenone with a biocatalyst such as an enzyme or a microorganism.

I Automated Biocatalyst Screening Methods

- 10 According to the present invention, an efficient and practical high throughput screening (HTS) process is used to identify the desired biocatalysts from hundreds of potential biocatalysts such as enzymes or microorganisms as well as a number of potential reaction parameters under which they can optimally function. The fact that such parameters, including solvent, solvent content, pH, temperature, time, and cosubstrates, are many times correlated non-linearly makes the screening task even more
- 15 challenging.

- A general HTS protocol that has been validated by a number of global projects within Pfizer is described in Yazbeck et al., *Adv. Synth. Catal.*, 2003, vol. 345, pp. 524-532. Using this approach, hundreds of reactions can be set up and analyzed within days, which otherwise might require weeks using simple vial preparation of reactions. A great advantage gained by using this protocol is that it requires
- 20 very small amounts of both the biocatalysts, e.g. enzymes, which may be quite expensive, as well as the racemic substrates being screened, which are commonly pharmaceutical intermediates available in limited amounts. The fundamental basis behind this HTS protocol is that enzymes can be stabilized and stored for months in suitable 96-well plates under certain preparative conditions. A second essential requirement is that a number of different analytical instruments be made available to analyze a variety of
- 25 substrates screened via these 96-well plates. Some of the analytical tools available include high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE), gas chromatography (GC), UV spectrophotometry, and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Choosing which analytical tool to use depends on the nature of the substrate, mainly its absorbance properties and volatility. Reactivity of the enzyme toward the substrates is usually analyzed first, followed by the analysis
- 30 of the reactive hits using chiral methods. The same sampled 96-well plate can be used to analyze both reactivity and enantioselectivity. The combination of this screening protocol with statistical optimization algorithms can quickly and efficiently allow the user to predict important conditions and suggest where further optimization should proceed.

35 II. Preparation of Optically Active 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol by Combination of Enzymatic Resolution and Chemical Transformation

A method is provided for the resolution of mixtures of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomers.

- In one embodiment, the method involves the use of a biocatalyst such as an enzyme or
- 40 microorganism that preferentially catalyzes a reaction of one enantiomer in a mixture. In the preferred embodiment, the method involves an enzymatic resolution, which is based on stereoselective hydrolysis of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters.

In another embodiment, the reacted enantiomer may be separated from the unreacted enantiomer on the basis of the new difference in physical structure.

22

-9-

5 In yet another embodiment, the reacted enantiomer may be converted to another enantiomer by chemical transformation with inversion.

In yet another embodiment, the conversion of the reacted enantiomer to another enantiomer may be performed in the mixture of the reacted enantiomer and the unreacted enantiomer.

10 II(a). Enzymatic Resolution Based on Stereoselective Hydrolysis of 1-(2,6-Dichloro-3-Fluorophenyl)Ethyl Esters

A method of stereoselective hydrolysis is provided for the enzymatic resolution of mixtures of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomers. Given the disclosure herein, one of skill in the art will be able to choose, using the high throughput screening (HTS) process described above, an enzyme or
15 microorganism that is selective for the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester enantiomer of choice or selective for the undesired enantiomer, as a method of eliminating it, by selecting one of the enzymes or microorganisms discussed below or by systematic evaluation of other known enzymes or microorganisms. Given this disclosure, one of skill in the art will also know how to modify the substrate as necessary to attain the desired resolution. Through the use of chiral NMR shift reagents, polarimetry, or chiral HPLC,
20 the optical enrichment of the recovered ester or alcohol can be determined. See, for example, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, v. 95, p. 512; Trost et al., *J. Org. Chem.* 1986, v. 51, pp. 2370-2374; *J. Org. Chem.* 1998, v. 63, p. 8957; *Tetrahedron: Asymmetry* 1995, v. 6, p. 2385; *Tetrahedron: Asymmetry* 1996, v. 7, p. 3285.

The following examples further illustrate the use of enzymes or microorganisms to resolve
25 racemic mixtures of enantiomers. Other known methods of resolution of racemic mixtures can be used in combination with the method of resolution disclosed herein. See, for example, Roger A Sheldon, *Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds*, New York, Marcel Dekker, 1993. All of these modifications are considered within the scope of the invention.

In this embodiment, the method includes reacting the hydroxyl group of a mixture of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomers with an acyl compound to form esters in which 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol is in the "carbinol" end of the ester. The mixture of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester enantiomers is then treated with a biocatalyst that preferentially cleaves, or hydrolyses, one of the enantiomers and not the other.

An advantage of this method is that it can be used to resolve a wide variety of 1-(phenyl)ethanols
35 that are optionally substituted in the carbinol moiety. The broad applicability of this method can reside in part on the fact that although the carbinol portion of the ester can play a role in the ability of a biocatalyst to differentiate enantiomers, the major recognition site for these biocatalysts can be in the carboxylic acid portion of the ester. Further, one may be able to successfully extrapolate the results of one biocatalyst/substrate study to another, seemingly different system, provided that the carboxylic acid
40 portions of the two substrates are the same or substantially similar.

Still another advantage of this method is that the separation of the unhydrolysed enantiomer and the hydrolysed enantiomer from the reaction mixture can be quite simple. The unhydrolysed enantiomer can be more lipophilic than the hydrolysed enantiomer and can be efficiently recovered by simple extraction with one of a wide variety of nonpolar organic solvents or solvent mixtures, for example, hexane

-10-

5 and hexane/ether. The less lipophilic, more polar hydrolysed enantiomer can then be obtained by extraction with a more polar organic solvent, for example, ethyl acetate, or by lyophilization, followed by extraction, for example, with ethanol or methanol.

The enzyme or microorganisms may be used alone or in combination. Depending upon the type of enzyme or microorganism used, either one of the optical isomers of the ester is predominantly hydrolyzed to give the optically active alcohol. Either one of the optical isomers may be obtained by the selection of a suitable enzyme or microorganism.

With the proper matching of enzyme and substrate, conditions can be established for the isolation of either 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomer. The desired enantiomer can be isolated by treatment of the racemic mixture with an enzyme that hydrolyses the desired enantiomer (followed by extraction of the polar hydrolysate with a polar solvent) or by treatment with an enzyme that hydrolyses the undesired enantiomer (followed by removal of the undesired enantiomer with a nonpolar solvent).

II(b). Biocatalysts

In one embodiment of the present invention, the method of enzymatic resolution employs an enzyme as a biocatalyst for stereoselective hydrolysis of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters. Examples of enzymes that catalyze the hydrolysis of esters include, but are not limited to, esterases, lipases and proteases (subtilisin and α -chymotrypsin). The enzyme may be any enzyme obtainable from animals, plants, microorganisms, etc. The enzyme may be employed in any conventional form such as in a purified form, a crude form, a mixture with other enzymes, a microbial fermentation broth, a fermentation broth, a microbial body, a filtrate of fermentation broth, and the like, either solely or in combination. In addition, the enzyme or microbial body may be immobilized on a resin.

Specific examples of the enzyme are those obtained from animal and plants useful in the present invention including, but not limited to, cow liver esterase, pig liver esterase, pig pancreas esterase, horse liver esterase, dog liver esterase, pig phosphatase, amylase obtainable from barley and potato and lipase obtainable from wheat. For example, applications of pig liver esterase in asymmetric synthesis are described in *Tetrahedron*, 1990, vol. 46, pp. 6587-6611, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 2nd Ed., Wiley-VCH 2002, vol. II, pp. 384-397. Other examples are hydrolases obtained from such microorganisms as *Rhodotorula*, *Trichoderma*, *Candida*, *Hansenula*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Alkaligenes*, *Pedococcus*, *Klebsiella*, *Geotrichum*, *Lactobacillus*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Actinomucor*, *Enterobacter*, *Torulopsis*, *Corynebacterium*, *Endomyces*, *Saccaromyces*, *Anthrobacter*, *Metshnikowia*, *Pleurotus*, *Streptomyces*, *Proteus*, *Gladiolus*, *Acetobacter*, *Helminthosporium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Absidia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Penicillium* and *Schizophyllum* as well as from lichen and algae.

Exemplary, commercially available enzymes suitable for use in the present invention include esterases such as, for example, pig liver esterase (Biocatalytics Inc), lipases such as Amano PS-30 (*Pseudomonas cepacia*), Amano GC-20 (*Geotrichum candidum*), Amano APF (*Aspergillus niger*), Amano AK (*Pseudomonas sp.*), *Pseudomonas fluorescens* lipase (Biocatalyst Ltd.), Amano Lipase P30 (*Pseudomonas sp.*), Amano P (*Pseudomonas fluorescens*), Amano AY-30 (*Candida cylindracea*), Amano N (*Rhizopus niveus*), Amano R (*Penicillium sp.*), Amano FAP (*Rhizopus oryzae*), Amano AP-12

5 (*Aspergillus niger*), Amano MAP (*Mucor melhei*), Amano GC-4 (*Geotrichum candidum*), Sigma L-0382 and L-3126 (porcine pancrease), Lipase OF (Sepracor), Esterase 30,000 (Gist-Brocard), KID Lipase (Gist-Brocard), Lipase R (*Rhizopus sp.*, Amano), Sigma L-3001 (Wheat germ), Sigma L-1754 (*Candida cylindracea*), Sigma L-0763 (*Chromobacterium viscosum*) and Amano K-30 (*Aspergillus niger*). Additionally, exemplary enzymes derived from animal tissue include chymotrypsin and pancreatin from
10 pancreas such as porcine pancreatic lipase (Sigma). Two or more, as well as a single, enzyme may be employed when carrying out the process of the present invention.

In addition, enzymes, which are serine carboxypeptidases can be used. These enzymes are derived from *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, wheat (*Triticum aestivum*) and *Penicillium janthinellum*. Commercially available cross-linked enzyme crystals may also be used such as from Altus
15 Biologics, Inc. (e.g., ChiroCLEC-CR, ChiroCLEC-PC, ChiroCLEC-EC).

The present invention is also directed to the use of thermostable esterases and genetically engineered esterases for the resolution of the esters. These enzymes, commercially available from ThermoGen, Inc., are especially suitable for use in industrial processes and are easy to use. In addition to functioning at a wide range of temperatures including higher temperatures, these thermostable enzymes
20 possess an increased shelf life which improves handling. The enzymes are also able to endure harsh, non-biological conditions (pH, salt concentrations, etc.) usually associated with industrial processes because of their stability under operational conditions. They can be immobilized for reuse in multiple applications, improving the cost-effectiveness of the process.

During the isolation of the products after enzymatic resolution, the enzymes are frequently
25 exposed to traces of organic solvents. In addition, some enzymatic resolutions are found to work best under a mixture of aqueous and organic solvents or in organic solvents alone. The esterase enzymes of the present invention are more tolerant to denaturing by many organic solvents compared to conventional enzymes which allows longer operational half lives. Most of the esterase enzymes are produced using genetic engineering techniques of gene cloning which ensures the purity of these enzymes and the ease
30 of process controls during scale up. Instead of isolated enzymes, there may also be employed a microorganism which can produce any enzyme discussed above.

In another embodiment of the present invention, the method of enzymatic resolution employs a microorganism as a biocatalyst for stereoselective hydrolysis of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl) ethyl esters. Specific examples of the microorganisms useful in the present invention include, but are not
35 limited to, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*, *Candida krusei*, *Candida cylindracea*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus chinensis*, *Mucor pusillus*, *Aspergillus niger*, *Alkaligenes faecalis*, *Torulopsis ernobii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Pediococcus acidilactici*, *Klebsiella pneumoniae*, *Absidia hyalosporea*, *Geotrichum candidum*, *Schizophyllum commune*, *Nocardia uniformis* subsp. *subtuyanarensis*, *Nocardia uniformis*, *Chromobacterium chocolateum*, *Hansenula anomala* var. *clavellii*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Achromobacter lyticus*, *Achromobacter parvulus*, *Achromobacter simplex*, *Torulopsis candida*, *Corynebacterium sepehonicum*, *Endomyces geotrichum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arthrobacter globiformis*, *Streptomyces griseus*, *Micrococcus luteus*,
40

-12-

5 *Enterobacter cloacae*, *Corynebacterium azul*, *Lacto bacillus casei*, *Cryptococcus albidus*, *Pichia*
polimorpha, *Penicillium frezuentans*, *Aureobasidium pullulans*, *Actinomucor elegans*, *Streptomyces*
grisens, *Proteus vulgaris*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Acetobacter aurantius*,
Helminthosporium sp. *Chromobacterium iodinum*, *Chromobacterium violaceum*, *Flavobacterium*
lutescens, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pleurotus ostreatus*, *Brevibacterium ammoniagenes*,
10 *Brevibacterium divaricatum*, *Escherichia coli*, *Rhodotulura minuta* var. *texensis*, *Trichoderma*
longibrachiatum, *Mucor javanicus*, *Flavobacterium arborescens*, *Flavobacterium heparinum*, and
Flavobacterium capsulatum.

The enzymes and/or microorganisms used in the present invention may be in crude form or in an
immobilized form. They can be immobilized on various solid supports without loss of stereospecificity or
15 change in stereo selectivity. The solid supports can be inert absorbents to which the enzyme is not
covalently bonded. Instead the enzyme is absorbed such as by interactions of hydrophobic or hydrophilic
portions of a protein with like regions of the inert absorbent, by hydrogen bonding, by salt bridge
formation, or by electrostatic interactions. Inert absorbent materials include, but are not limited to,
synthetic polymers (e.g. polystyrene, poly-(vinylalcohol), polyethylene and polyamides), mineralaceous
20 compounds (e.g. diatomaceous earth and Fuller's earth), or naturally occurring polymers (e.g. cellulose).
Specific examples of such materials include Celite 545 diatomaceous earth, Abelite XAD-8 polymeric
resin beads and polyethylene glycol 8000.

The enzyme may also be immobilized on the support to which the enzyme is covalently bonded
(e.g., oxirane-acrylic beads and glutaraldehyde activated supports). Specific examples include Eupergit C
25 oxirane-acrylic beads and glutaraldehyde activated Celite 545. Other possible immobilizing systems are
well known and are readily available to those skilled in the art of enzyme immobilization.

Instead of conventional immobilization methods described above, the enzymes can also be
conveniently recycled for reuse by simply precipitating out the used enzymes with ammonium sulfate. The
precipitated enzyme-ammonium sulfate can be used directly in the next enzymatic hydrolysis. Salts are
30 commonly used in purification of enzymes. They generally protect the protein enzymes by reducing
solvent activity. For example, ammonium sulfate, potassium sulfate, potassium phosphate, sodium
chloride, etc., can be used in recovering the enzyme activity.

-- The enzyme or microorganisms may be used alone or in combination. Depending upon the type
of enzyme or microorganism used, either one of the optical isomers of the ester is predominantly
35 hydrolyzed to give the optically active alcohol. Either one of the optical isomers may be obtained by the
selection of a suitable enzyme or microorganism.

II(c). Substrates

The most effective acyl group to be used to esterify 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol can be
40 determined without undue experimentation by evaluation of a number of homologs using the selected
enzyme system. Non-limiting examples of acyl groups that can be evaluated for use with a particular
enzyme or microorganism include alkyl carboxylic acids and substituted alkyl carboxylic acids, including
acetic acid, propanoic acid, butyric acid, and pentanoic acid. With certain enzymes or microorganisms, it
may be preferred to use an acyl compound that is significantly electron-withdrawing to facilitate hydrolysis

5 by weakening the ester bond. Examples of electron-withdrawing acyl groups include α -haloesters such as 2-chloropropionic acid, 2-chlorobutyric acid, and 2-chloropentanoic acid. α -Haloesters are excellent substrates for lipases. In addition, the use of succinic anhydride as acylating agent for practical resolution of aryl-alkyl alcohols through lipase-catalyzed acylation has been reported in Bouzemi et al. *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, pp. 627-630.

10 The different methods of esterification known in the art may be used for preparing the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters substrates. See, for example, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, vol. 18, p. 1391; *J. Org. Chem.* 1994, vol. 59, p. 6018.

II(d). Reaction Conditions for Enzymatic Hydrolysis

15 The enzymatic hydrolysis of the present invention may be carried out by contacting the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters with the enzyme or microorganism, usually in an aqueous buffer medium with good agitation.

The buffer medium may be inorganic acid salt buffers (e.g. potassium dihydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate), organic acid salt buffers (e.g. sodium citrate), or any other suitable buffer.

20 The concentration of the buffer may vary from 0.005 to 2 M, preferably from 0.005 to 0.5 M and will depend on the specific 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester and the enzyme or microorganism used.

Enzymatic hydrolyses performed under heterogeneous conditions can suffer from poor reproducibility. Therefore, it is preferred that the hydrolyses be performed under homogeneous conditions. Depending on the solubility of the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl esters, homogeneity can be
25 achieved through the use of surfactants. Preferred surfactants include but are not limited to non-ionic surfactants such as alkylaryl polyether alcohols. A preferred surfactant is octylphenoxy polyethoxyethanol, commercially available as Triton X-100 (Sigma Chemical Company). An effective amount of a surfactant is used. Typical amounts can vary from 0.05% to about 10% (v/v).

However, these surfactants not only assist in dissolving the starting material, they also enhance
30 the aqueous solubility of the product. Therefore, although the enzymatic reaction can proceed more effectively with the addition of a non-ionic surfactant than under heterogeneous conditions, the isolation of both the recovered starting material and the product can be made more difficult. The product can be isolated with appropriate chromatographic and chemical (e.g., selective salt formation) techniques.

It is sometimes preferable to add an effective amount of an organic cosolvent to increase product
35 solubility to facilitate the reaction. Examples of co-solvents include but are not limited to acetonitrile, THF, DMSO, DMF, alcohols, etc. Effective amounts of a co-solvent include from 1% to 30% (v/v) depending on the specific 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester and the enzyme or microorganism used.

The enzymatic hydrolyses are typically carried out with a catalytic amount of the enzyme in an aqueous buffer that has a pH that is close to the optimum pH for the enzyme in question. As the reaction
40 proceeds, the pH drops as a result of liberated carboxylic acid. Aqueous base can be added to maintain the pH near the optimum value for the enzyme. The progress of the reaction can be easily determined by monitoring the change in pH and the amount of base needed to maintain pH.

The pH of the buffers or the pH of the reaction is normally from 4 to 10, preferably from 5 to 9, most preferably from 7 to 8. The reaction temperature may vary from 0 to 100°C. and will depend on the

5 specific 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester and the enzyme or microorganism used. The reaction time is generally from 1 hour to 70 hours and will depend on the specific 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester, enzyme concentration and the enzyme or microorganism used. Normally, the enzymatic hydrolysis is allowed to proceed for a period sufficient to generate a satisfactory quantity of the desired ester or 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol in satisfactory optical purity. As the reaction
10 progresses, the amount of desired ester or alcohol and its optical purity can be monitored by HPLC and chiral HPLC. Normally, the conversion is carried to approximately 50%, after which the alcohol and the esters may be obtained in good yields after isolation.

The amount of enzyme used can vary widely from 5 units to 12,000 units of enzyme per mole of starting material. The amount of enzyme needed will depend on the temperature, the specific 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester, the enzymes and/or microorganism used, and the desirable reaction
15 time. It may also be desirable to use a large amount of enzymes in some cases to ensure a practically short reaction time, especially when the enzymes are immobilized and can be reused for many turnovers. The concentration of the ester substrate may be from 0.1 g/L to 500 g/L and depends on the specific 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester and the enzyme and/or microorganism used.

20

II(e). Product Isolation

The desired products, the optically pure (or enriched) unreacted ester and the optically pure (or enriched) alcohol can be isolated from the hydrolysis mixture using conventional methods such as extractions, acid-base extractions, filtration, chromatography, crystallization or combinations thereof.
25 Andreas Liese, et al, *Industrial Biotransformations*, Weinheim: WILEY-VCH, 2000. The recovered enzyme or microorganism may be recycled as described above.

II(f). Enantiomeric conversion based on Esterification and Chemical Hydrolysis with Inversion

According to the present invention, either 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomer may
30 be converted to the other 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomer if desired. This conversion may be performed, for example, by a nucleophilic substitution reaction at C-1 accompanied by a steric inversion. Such reaction can be conducted with the use of a nucleophilic reagent.

Methods for the conversion of the optically active alcohol to the corresponding enantiomer include, but are not limited to, the following methods.

35 For example, one method comprises converting the hydroxyl group on the asymmetric carbon atom of the particular enantiomer into an organic sulfonic acid ester, preferably a methanesulfonic acid ester or a p-toluenesulfonic acid ester, which is directly converted into the other enantiomer by nucleophilic substitution and inversion of configuration via one of their carboxylic acid esters and its subsequent solvolysis or hydrolysis. The sulfonic acid esters are prepared by known methods by reaction of either 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol enantiomer with organic sulfonyl halides, preferably methanesulfonyl chloride and p-toluenesulfonyl chloride, in aprotic solvents, preferably pyridine and dichloromethane, if appropriate in the
40 presence of a base, such as triethylamine.

A method comprising esterifying an optically active alcohol with fuming HNO₃ or mesyl chloride to nitrate or mesylate, and hydrolyzing the resultant nitrate or mesylate with a steric inversion under neutral

-15-

5 (In the presence of 0.7 to 2.0 equivalent of CaCO_3 or NaOAc), basic (K_2CO_3) or acidic conditions (2.5% aqueous H_2SO_4 or 2.5% aqueous HNO_3) is described, for example, in Danda et al., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701-8716; and Wang et al., *J. Med. Chem.*, 2000, vol. 43, No. 13, pp. 2568-2574.

A method comprising converting an optically active alcohol to a sulfonic acid ester such as p-toluenesulfonic acid ester, allowing an organic acid salt such as tetraethylammonium acetate and sodium acetate (and acetic acid) to react with the resulting sulfonic acid ester to sterically invert to the
10 corresponding organic acid ester, and hydrolyzing the resultant organic acid ester is described, for example, in *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, v. 87, p. 3682; and *J. Chem. Soc.*, 1954, p. 965.

A method comprising esterifying an optically active alcohol to a carboxylic acid ester such as trichloroacetic acid ester, and hydrolyzing the resultant carboxylic acid ester, in a water-ether solvent such
15 as 75% H_2O -dioxane is described, for example, in *Chem. Lett.*, 1976, p. 893.

Another example is the Mitsunobu reaction, which reaction comprises reacting an optically active alcohol with an organic acid in the presence of triarylphosphine (for example, triphenylphosphine) and an azodicarboxylic acid ester such as diethyl azodicarboxylate to form the sterically inverted corresponding organic acid ester, and hydrolyzing the resulting ester. The organic acid includes, for example, formic
20 acid, acetic acid, trichloroacetic acid, trifluoroacetic acid, benzoic acid and the like. The formation of the organic acid ester may be conducted, for example, at a temperature of about -60°C to 60°C . The reaction may be carried out in an inert solvent such as an aromatic hydrocarbon (for example, benzene, toluene, etc.) and an ether (for example, tetrahydrofuran, etc.). The proportions of trialkylphosphine, organic acid and azodicarboxylic acid ester based on 1 mole of an optically active alcohol are respectively
25 about 0.7 to 2.0 moles. The hydrolysis of the organic acid ester can be conducted by a conventional manner such as acidic or basic hydrolysis. See, for example, *Synthesis*, 1981, p. 1; Danda et al., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701-8716; Vantinen et al. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, vol. 6, pp. 1779-1786, and Liu et al., *Chirality*, 2002, vol. 14, pp. 25-27.

30 II(g). Combination of Enzymatic Hydrolysis, Esterification and Chemical Hydrolysis with Inversion

One major limitation of the enzymatic resolution method is that the maximum yield is 50% based on the racemate. As a method to overcome this limitation, combination of enzymatic hydrolysis, esterification and chemical hydrolysis with inversion may be used. See, for example, Danda et al.,
35 *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701-8716; Vantinen et al. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, vol. 6, pp. 1779-1786; and Liu et al., *Chirality*, 2002, vol. 14, pp. 25-27.

According to the present invention, a crude mixture of the optically pure (or enriched) unreacted ester and the optically pure (or enriched) alcohol obtained by the enzymatic hydrolysis, can be subject to enantiomeric conversion based on esterification and chemical hydrolysis with inversion in one pot according to the procedures described above.

40 Depending on the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester substrates, an appropriate enzyme or microorganism can be employed for enzymatic hydrolysis and appropriate conditions for chemical hydrolysis can be chosen. For example, a crude mixture of the unreacted (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester and the reacted (1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol without separation can be esterified with mesyl chloride as described in Danda et al., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701-8716; and Wang et al., *J.*

- 5 *Med. Chem.*, vol. 43, pp. 2566-2574. Successively, a resultant crude mixture of the corresponding (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl mesylate and (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester without purification can be hydrolyzed to afford (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol, with inversion of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl mesylate and retention of (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester. In a specific embodiment, the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl ester substrate is 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate. In a specific embodiment, the enzyme is pig liver esterase.

The methods for conversion of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol to (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol can also be applied to the conversion of (*S*)-enantiomer to (*R*)-enantiomer.

15 II(h) Racemization and Application to Dynamic Kinetic Resolution

- 15 Either of the optically pure (or enriched) unreacted ester and the optically pure (or enriched) alcohol can be racemized if desired. The optically pure (or enriched) unreacted ester can be racemized by heating in the appropriate base under appropriate conditions. Alternatively, the optically pure (or enriched) unreacted ester can be racemized by heating in acid in the presence of an alcohol under appropriate conditions. The optically pure (or enriched) unreacted alcohol can also be racemized and
- 20 converted to the racemic esters by heating in acid under appropriate conditions. In this manner, excellent yields can be achieved of either the optically pure (or enriched) unreacted ester or the optically pure (or enriched) alcohol by this combination of stereoselective enzymatic hydrolysis and racemization techniques.

- For example, a method of dynamic kinetic resolution (or second-order asymmetric transformations) can be used for secondary alcohols, in which the alcohols are continuously racemized with metal catalysts, such as ruthenium-based catalytic systems, during an enzymatic resolution. Dijkman et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, vol. 13, pp. 879-884; Kim et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, pp. 11494-11495; Choi et al., *J. Org. Chem.*, 2004, vol. 69, 1972-1977.

30 II(i) Enzyme-Catalyzed Acylation

- Enzymatic reactions have proved to be a convenient method for obtaining optically enriched compounds from their racemic form by kinetic resolution. C.-H. Wong and G.M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford (1994); K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin (1995); Gotor, Vicente. "Enzymes in Organic Solvents: The Use of Lipases And (R)-Oxynitrilase For The Preparation Of Products Of Biological Interest." *Molecules* [Electronic Publication] 2000, vol. 5, pp. 290-292.

- For example, alcohols can be resolved through lipase-catalyzed transesterification (acylation) with enol esters in a generally irreversible reaction. Y.F. Wang, J.J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter and C.-H. Wong. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, vol. 110, pp. 7200-7205. However, to be of preparative interest such a process requires (i) a high enantioselectivity factor *E*, (ii) easy separation of the unreacted substrate (alcohol) from the product (ester). It was shown that the use of a cyclic anhydride as an acylating agent offers a convenient solution to this requirement. Bouzemi et al. *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, pp. 627-630. The acid-ester produced can be readily separated from the unreacted alcohol by a simple aqueous base-organic solvent liquid-liquid extraction. Moreover, since the separation of these

-17-

5 compounds is easy even for very different amounts of product and unreacted substrate, alcohols of high enantiomeric purity can be obtained from a racemic substrate even in the cases of low *E* values, provided the acylation is carried out to high conversion.

Reactions can be carried out using racemic substrate dissolved in diethyl ether. Vinyl or isopropenyl acetates (2 equivalents) or succinic anhydride (1 equivalent), can be then added, followed by
10 the enzyme. For example, commercially available lipases such as *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL) and *Candida antarctica* lipase B (CAL B), an immobilized enzyme can be used. The resulting mixture can be stirred at room temperature for the appropriate time to reach approximately 50% conversion. With enol esters as acylating agents, the unreacted alcohol and the acetate produced were separated by silica-gel flash chromatography. The ee's of both compounds could be measured before separation through
15 analysis using chiral HPLC. With succinic anhydride as acylating agent, the unreacted alcohol, for example, (*S*)-alcohol, and the (*R*)-monosuccinate produced can be separated by aqueous base-organic solvent liquid-liquid extraction. The aqueous phase can be made alkaline with sodium hydroxide and the resulting (*R*)-alcohol extracted with an organic solvent. Enantiomeric excesses of the unreacted (*S*)-enriched-alcohol and the (*R*)-enriched-alcohol produced can be evaluated, for example, by chiral HPLC.

20

III. Enantioselective Bio-Reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone

The present invention provides a method for preparing an optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol comprising the step of reducing 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone by a biocatalyst in an enantioselective manner in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of
25 organic and aqueous solvents to give the optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. Given the disclosure herein, one of skill in the art will be able to choose, using the high throughput screening (HTS) process described above, an enzyme or microorganism which selectively reduces 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone to either enantiomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol, by selecting of one of the enzymes or microorganisms discussed herein or by systematic evaluation of other
30 known enzymes or microorganisms. Those skilled in the art will understand based upon the description provided herein how to select the conditions of the bio-reduction reaction such that the desired stereoselectivity is achieved. Through the use of chiral NMR shift reagents, polarimetry, or chiral HPLC, the optical enrichment of the recovered alcohol can be determined. See, for example, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, v. 95, p. 512; Trost et al., *J. Org. Chem.* 1986, v. 51, pp. 2370-2374; *J. Org. Chem.* 1998, v. 63, p. 8957; *Tetrahedron: Asymmetry* 1995, v. 6, p. 2385; *Tetrahedron: Asymmetry* 1996, v. 7, p. 3285.

The desired enantiomer, for example, (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol, is then optionally isolated from any residual substrate and other reaction components using methods well known in the art (e.g., the reaction mixtures can be extracted with a suitable solvent such as MeOH and analyzed by RP-HPLC; the corresponding alcohol can be separated from the other organics by flash
40 chromatography, and the purified alcohol can be analyzed by chiral HPLC, see, e.g., Allenmark et al. *Enzyme Microbial Technol.*, 1989, vol. 11, pp. 177-179), prior to its preferred use as an intermediate in synthesis of certain enantiomerically enriched, ether linked 2-aminopyridine analogues that potentially inhibit auto-phosphorylation of human hepatocyte growth factor receptor, as described in EXAMPLE 3 herein.

5 Generally, only a very small quantity (e.g., from about 1% ee to about 5% ee), if any, of the undesired enantiomer is produced by the stereoselective bio-reduction processes of this invention. Yet, where so desired, the amount of the desired enantiomer can be substantially separated from the amount of the undesired enantiomer, for example, by crystallization.

10 The methods of the present invention are readily carried out. Thus, an enzyme or microorganism is either incubated (the enzyme, broken cell preparation, dehydrated preparation, or any other suitable preparation of the microorganism) or fermented (intact microorganism) in the presence of an amount of the substrate, 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone, to produce a greater amount of the desired enantiomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol, than the undesired enantiomer, thereby, in one step, resulting in the optically enriched enantiomer.

15 Suitable in principle for the method according to the invention are all microorganisms such as fungi, yeasts or bacteria or enzymes or enzyme systems such as the various alcohol and aldehyde dehydrogenases, the lactate or formate dehydrogenases, preferably alcohol and aldehyde dehydrogenases, able to reduce carbonyl compounds or aldehydes to the alcohols. The microorganisms can be used directly after cultivation (wet biomass) or after lyophilization (dry matter) for the process according to the invention. The microorganisms or enzymes advantageously used are those able to reduce 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone to the desired enantiomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol with an enantiomeric purity exceeding 85% ee, preferably exceeding 90% ee and very particularly preferably exceeding 95% ee. Examples of suitable microorganisms are organisms of the genera *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Diplodia*,
25 *Endomycopsis*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Mucor*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pfaffia*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Spondiobolus*, *Streptomyces*, *Torulopsis* or *Yarrowia*. The following species of the abovementioned genera are advantageously used: *Alcaligenes eutrophus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Beauveria bassiana*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida membranaefaciens*,
30 *Candida methylca*, *Candida parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Curvularia falcata*, *Diplodia gossypina*, *Cryptococcus macerans*, *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*, *Hansenula beckii*, *Hansenula holstii*, *wingei*, *Hansenula polymorpha*, *Mucor sp.*, *Nocardia rubropertincta*, *Pfaffia rhodozyma*, *Pichia glucozyma*, *Pichia fermentans*, *Pichia capsulata*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula glutinis*,
35 *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula termusruber*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis enokii*, *Torulopsis methanothermo* and *Yarrowia lipolytica*. The various yeast genera such as *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pfaffia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis* and *Yarrowia* are preferably used. Particularly preferably used are the genera and species *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida membranaefaciens*, *Candida methylca*, *Candida parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Hansenula anomala*, *Hansenula beckii*, *Hansenula holstii*, *wingei*, *Hansenula*

5 *polymorpha*, *Pfaffia rhodozyma*, *Pichia glucozyma*, *Pichia fermentans*, *Pichia capsulata*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula termusruber*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces japonicus*,
10 *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis enokii*, *Torulopsis methanothermo* and *Yarrowia lipolytica*, very particularly preferably the genera and species *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Pichia fermentans*, *Hansenula polymorpha*, *Rhodotorula gracilis*, *Candida utilis* and *Candida magnoliae*.

15 Microorganisms may be genetically transformed to improve enzyme production in a cell, to provide coenzyme-regenerating enzymes in the same cell, to improve poor enantioselectivities due to presence of plural enzymes in a cell with overlapping substrate specificities but different enantioselectivities, to solve the problem of overmetabolism, etc. as described, for example, in Nakamura et al. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659-2681.

20 One or more of any suitable microorganism may be used in the processes of the present invention. As described earlier, the microorganism used in the subject processes may be intact, any suitable preparation thereof, e.g., a broken cell preparation thereof, a dehydrated preparation thereof, and be either free or immobilized. However, where a non-intact microorganism is employed in the present invention such as, for example, a broken cell preparation, e.g., cell extract, acetone powder enzymatic
25 preparation, or the enzyme derived therefrom, those skilled in the art would understand that a suitable co-factor for the enzyme is also included.

Those skilled in the art will understand from the description provided herein and their related knowledge how to prepare a suitable broken cell preparation such as described, for example, in Patel et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, vol. 38, pp. 219-223. Those skilled in the art will understand from the
30 description provided herein and their related knowledge how to prepare a suitable acetone powder enzymatic preparation such as described, for example, in Nakamura et al., *Tetrahedron Lett.*, 1996, vol. 37, pp. 1629-1632; Nakamura et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659-2681.

The enzyme may be any enzyme obtainable from animals, plants, microorganisms, etc. The enzyme may be employed in any conventional form such as in a purified form, a crude form, a mixture
35 with other enzymes, a microbial fermentation broth, a fermentation broth, a microbial body, a filtrate of fermentation broth, and the like, either solely or in combination. In addition, the enzyme or microbial body may be immobilized on a resin.

In addition, an enzyme (e.g., an oxidoreductase) of any suitable microorganism may also be used in the subject processes, and this enzyme may be isolated from the microorganism by any suitable
40 method known to those skilled in the art and, as for the intact microorganism, may be used in the subject process in either free or immobilized form. Those skilled in the art will understand from the description provided herein and their related knowledge how to isolate and purify the enzyme of the suitable microorganism such as described, for example, in WO 03/093477.

25
37

-20-

5 Exemplary, commercially available enzymes suitable for use in the present invention include dehydrogenases and reductases, which are classified under E.C.1.1.1 and capable of catalyzing the reduction of carbonyl groups, such as, for example, a KRED-M27 KIT of ketone reductases from Biocatalytics, Inc., horse liver alcohol dehydrogenase (Grunwald et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, vol. 108, pp. 6732-6734; Johansson et al., *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 227, pp. 551-555; Adolph et al.,
10 *Biochemistry*, 2000, vol. 39, pp. 12885-12897; Wong et al. *Tetrahedron Organic Chemistry*, 1994, vol. 12, pp. 149-150), yeast alcohol dehydrogenase, *Thermoanaerobium brokil* alcohol dehydrogenase and *Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase.

The natural substrates of the enzymes are alcohols such as ethanol, lactate, glycerol, etc. and the corresponding carbonyl compounds; however, unnatural ketones can also be reduced enantioselectively.
15 To exhibit catalytic activities, the enzymes require a coenzyme such as NADH or NADPH from which a hydride is transferred to the substrate carbonyl carbon. There are four stereochemical patterns that enable the transfer of the hydride from the coenzyme, NAD(P)H, to the substrate. With E1 and E2 enzymes, the hydride attacks the *si*-face of the carbonyl group, whereas with E3 and E4 enzymes, the hydride attacks the *re*-face, which results in the formation of (*R*) and (*S*)-alcohols, respectively. On the
20 other hand, E1 and E3 enzymes transfer the pro-(*R*)-hydride of the coenzyme, and E2 and E4 enzymes use the pro-(*S*)-hydride. Examples of the E1-E3 enzymes are as follows:

E1: *Pseudomonas* sp. alcohol dehydrogenase
Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase
E2: *Geotrichum candidum* glycerol dehydrogenase
25 *Mucor javanicus* dihydroxyacetone reductase
E3: Yeast alcohol dehydrogenase
Horse liver alcohol dehydrogenase
Moraxella sp. alcohol dehydrogenase

30 The directed evolution of enzymes may be used to improve the reducing function of the enzymes or biocatalysts for reduction may be tailored by using catalytic antibodies technique as described, for example, in Nakamura et al. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659-2681.

The microorganisms suitable for use in the subject stereoselective microbial reduction may be prepared by any suitable method known to those skilled in the art. An example of a suitable method for
35 the preparation of a microorganism from a commercially purchased stock is provided below. The method provided below may be used for any microorganism suitable for use in the present inventive process, and those skilled in the art will understand from the description provided herein how to modify any part of the procedure, e.g., method of preparing the microorganism, free or immobilized, washed or unwashed; method of contacting of the amount of the substrate with the microorganism; growth medium components
40 and conditions, e.g., temperature, pH and the like; or incubation conditions, to achieve the desired result in any particular process.

Those skilled in the art will understand from the description provided herein how to prepare suitable immobilized microorganism such as described, for example, in Bauer et al., *Biotechnol. Lett.*, 1996, 18, pp. 343-348 or suitable immobilized enzyme such as described, for example, in Svec, F.;

-21-

- 5 Gemeiner, P. "Engineering aspects of carriers for immobilized biocatalysts." *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 1996, vol. 13, pp. 217-235.

Any suitable method of contacting the amount of the substrate with the microorganism or enzyme reduction system can be used in the present invention. The substrate can be contacted with the microorganism or the enzyme reduction system in any suitable order. For example, the substrate can be added to a medium, such as a culture broth, comprising the microorganism, free or immobilized, or some combination thereof; or the medium can comprise the substrate and the microorganism can then be added to such medium; or the substrate and the microorganism can be added together to such medium; or the substrate can be added to a broken cell preparation thereof; or the substrate can be added to a dehydrated preparation of the microorganism; or either the substrate or the microorganism or enzyme reduction system can be added to a suitable solvent comprising the other; and the like. For example, the enzyme reduction system can be added to an appreciably organic solvent with the contacting occurring by adding the substrate to that solvent. Those skilled in the art will also understand based on the present description how to contact by adding the substrate adsorbed to a resin. Moreover, those skilled in the art will understand from the description provided herein how to modify any part of the subject process as desired.

For the process according to the invention, the microorganisms can be first cultivated under nitrogen-limited conditions and, after harvesting the cells, for example by centrifugation, used for the process according to the invention. The reduction can be carried out with whole cells, cell digests or crude enzyme extracts obtained from the cells, or purified enzymes. The process can be carried out in aqueous medium in the presence of a carbon source in the case of whole cells or of a reducing agent such as NADH or NADPH and of a cofactor recycling, such as with the aid of formate dehydrogenase and formic acid, and, where appropriate, other enzymes in the case of cell digests, crude extracts or pure enzymes. Addition of further nutrients in the reduction with whole cells, such as a nitrogen source, vitamins or phosphates, is inexpedient because unwanted side reactions are observed under these conditions, for example, which can result in deficient product quality or else workup problems. Suitable as carbon source for the microorganisms are all carbon sources able to provide the cells with the reducing equivalents necessary for the reduction. Examples of carbon sources which may be mentioned here are mono- or disaccharides such as glucose, mannose, maltose, sucrose, primary or secondary alcohols such as methanol, ethanol, propanol, polyols such as glycerol, lower carboxylic acids such as lactic acid, malic acid or amino acids such as glutamate. Conversion of the precursor with microorganisms in aqueous solution in the presence of a carbon source has the advantage that neither precursor nor product is metabolized and no by-products are formed.

The reaction of bio-reduction can be carried out in pure water or in aqueous buffers without addition of other solvents or solvent mixtures. To improve the solubility of the precursor, 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone, it is possible to add water-miscible organic solvents such as tetrahydrofuran, acetonitrile, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, dimethylacetamide, primary or secondary alcohols, carboxylic acids, lactones such as γ -butyrolactone, which are able to improve the solubility of the precursor, 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone, to the reaction.

-22-

5 The reaction may be carried out at from 0 °C to 50 °C, preferably from 10 °C to 45 °C, particularly preferably from 15 °C to 40 °C.

 The reaction times depend on microorganism or enzyme and are from 1 to 72 hours, preferably from 1 to 48 hours.

10 Any suitable duration of growth of the microorganism, contacting of the microorganism with the amount of the substrate, and incubation of the substrate with the microorganism can be used in the present invention. Suitable growth of the microorganism may be achieved, e.g., within about 24 h, 48 h, or 72 h, at which time a suitable aliquot of a solution of the amount of the substrate in a suitable solvent, preferably ethanol, may be added to the culture. The fermentation may then be continued for, e.g., from about two to about six days, and preferably, e.g., for about five days. The progress of the reaction can
15 easily be followed by conventional methods after extraction of the product with an organic solvent. The fermentation broth may be extracted using any suitable extraction method whereby, for example, a suitable solvent, such as, for example, ethylacetate, methyl isobutylketone, methyl ethylketone, methylene chloride, and the like, preferably, ethylacetate, removes the organic components from the fermentation broth. Methanol can also be used to extract material from the cells into the methanol-water mixture. After
20 extraction of the fermentation broth and separation of the organic and aqueous phases, the compounds comprising the organic residue may be determined using any suitable method, such as, for example, chromatography, preferably, chiral HPLC.

 The reaction is preferably carried out under aerobic conditions, i.e., with aeration in the case of conversion with microorganisms, preferably with gentle aeration. However, conversion under anaerobic
25 conditions is also possible. The process can be carried out continuously or batchwise.

 The product from any of the above reactions may be purified by phase separation and/or extraction into a suitable solvent, such as dichloromethane and thereafter, if required it may be chromatographed.

30 The above mentioned reactions may also be carried out using continuous production methods involving continuous recycling of the organic phase in the reaction or immobilization of the cells and passing the substrate in organic solution over the immobilized biomass in a column, loop reactor or other similar reactor.

 Hence, as would be understood by those of skill in the art, variation of the growth medium, the conditions of fermentation, and/or the conditions of the reduction (e.g., the temperature, pH, and the
35 amount of substrate) can be altered to control the yield of the resultant compounds and their relative rates of production. In general, the techniques employed in the present invention will be chosen with regard to industrial efficiency. The growth media, conditions of fermentation and relative amounts of microorganism, or enzyme reduction system, and of the substrate described herein, are merely illustrative of the wide variety of media, fermentation conditions and amounts of starting materials which may be suitably
40 employed in the present invention as would be appreciated by those skilled in the art, and are not intended to be limiting in any way.

 Any suitable methods for isolating and/or purifying any of the products of the subject processes may be used in the present invention including filtration, extraction, crystallization, column

-23-

5 chromatography, thin-layer chromatography, preparative low pressure liquid chromatography or HPLC, or any suitable combination of such methods.

The present invention is illustrated by the following EXAMPLES. The foregoing and following description of the present invention and the various embodiments are not intended to be limiting of the invention but rather are illustrative thereof. Hence, it will be understood that the invention is not limited to
10 the specific details of these EXAMPLES.

EXAMPLES

Materials.

Suitable 96 well plates and accessories were obtained from VWR international. Analytical
15 instruments including the Tecan Genesis 2000 Workstation (Research Triangle Park, NC), Agilent 220 HPLC auto sampler and 6890N GC (Agilent Technologies, CA), SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA), Beckman Coulter P/ACE MDQ (Fullerton, CA), and Waters/Micromass ZQ LC/MS
- (Waters, MA) were purchased from their respective suppliers. Eppendorf thermomixer-R was purchased from VWR. Chiral HPLC columns used in analysis were obtained from Chiral Technologies (Exton, PA)
20 and Phenomenex (Torrance, CA).

The majority of enzymes utilized in screening plate were obtained from various enzyme suppliers including Amano (Nagoya, Japan), Roche (Basel, Switzerland), Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark), Altus Biologics Inc. (Cambridge, MA), Biocatalytics (Pasadena, CA), Toyobo (Osaka, Japan), Sigma and Fluka. Table 1 illustrates specific enzyme sources corresponding to each enzyme. The Lipase-PS Activity
25 kit was purchased from Sigma. Commercially available pig liver esterase was purchased from Biocatalytics (Pasadena, CA) as a crude ammonium sulfate suspension sold under the name PLE AS (Catalog # ICR-123).

The majority of solvents utilized during optimization was obtained from EM Science (Gibbstown, NJ) and were of the highest purity available.

30 HPLC Methods

HPLC analysis of the screened samples was performed on an Agilent 1100 HPLC with 96 well auto sampler. Reactions were performed in an Eppendorf thermomixer-R (VWR).

Every HPLC sample was made by taking 2x50 μ L from the reaction mixture, then combined and diluted with 2 mL of acetonitrile. 100 μ L of that solution were further diluted with 400 μ L of acetonitrile and
35 injected in the HPLC.

Non-chiral HPLC Method

Using detector wavelength 254 nm; Phenomenex luna C18 column, 3 μ m, C18, 4.6 x 30 mm; flow rate 2.0 mL/min; injection volume: 5 μ L; mobile phases: A: Water-0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) B: Acetonitrile-0.1 % TFA; samples were run on the gradient (0.5 min post-run)

40		Time	%B	%C	%D
	1	0.00	5.0	0.0	0.0
	2	1.67	65.0	0.0	0.0
	3	2.00	95.0	0.0	0.0
	4	2.50	95.0	0.0	0.0

37

-24-

5	5	2.60	5.0	0.0	0.0
	6	3.00	5.0	0.0	5.0

Chiral HPLC Methods

Alcohol 1: using detector wavelength: 254 nm; Chiralcel ADR-H, 3 μ m, C18, 4.6 x 150 mm; flow rate 0.8 mL/min; Injection volume: 10 μ L; mobile phases: A: Water B: Acetonitrile; isocratic: 50 % B for 15 min.

Acetate 2: chiral method using detector wavelength: 254 nm; Chiralcel OJ-RH, 3 μ m, C18, 4.6 x 150 mm; flow rate 0.6 mL/min; injection volume: 10 μ L; mobile phases: A: Water B: Acetonitrile; isocratic: 50 % B for 15 min.

15

Preparation of Screening Plates

Preparation of screening plates has been carried out in according to Yazbeck et al., *Adv. Synth. Catal.*, 2003, vol. 345, pp. 524-532.

Specifically, preparation usually takes on the order of 1-2 days and entails the preparation of the enzyme stock solutions (100 mg/mL) and the dispensing of these stock solutions into 96-well screening plates, or "screening kits". The dispensing of the stock solutions into a screening plate is carried out by an automated liquid handler workstation, which can be programmed to accurately dispense 10 μ L of each individual enzyme into the appropriate location in each 96-well plate.

When choosing a 96-well plate format, the plates need to be both solvent and temperature resistant, therefore, it is recommended to use polypropylene plates. The plate volume and morphology also need to be considered. The reactions herein are carried out in 100 μ L reaction volumes in plates no larger than 500 μ L. V-bottom plates tend to improve solution agitation and allow for cleaner sampling after centrifugation.

Once the plates are prepared, they can be sealed with either adhesive foil or with a penetrable mat cover and stored at -80 °C for months or even years.

In cases where anhydrous conditions are required, such as acylation and amidation reactions, the screening plates must be lyophilized prior to use. In order to remove the water from each well, the plate is lyophilized for 10 to 24 hours at a chamber temperature of -20 °C. After lyophilization, the plates can be stored at 4 to 8 °C.

35

Procedure for Enzyme Screening

The resolution of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate was carried out as follows. A 96-well plate prepared as described above was thawed for 5 minutes. 80 μ L of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) was then dispensed into the wells using a multi-channel pipette. 10 μ L of the substrate stock solution (50 mg/mL acetonitrile) was then added to each well via a multi-channel pipette, and the 96 reactions were incubated at 30 °C and 750 rpm. The reactions were sampled after 16 hours by the transfer of 25 μ L of the reaction mixture into a new 96-well plate, which was then quenched by the addition of 150 μ L of acetonitrile. The 96-well plate was then centrifuged, and the organic supernatant

40

-25-

5 transferred from each well into another 96-well plate. Sampled reactions were then sealed using a penetrable mat cover and transferred to an HPLC system for analysis. The same plate was used to analyze the samples for both reactivity and enantioselectivity using alternating columns on the HPLC simultaneously.

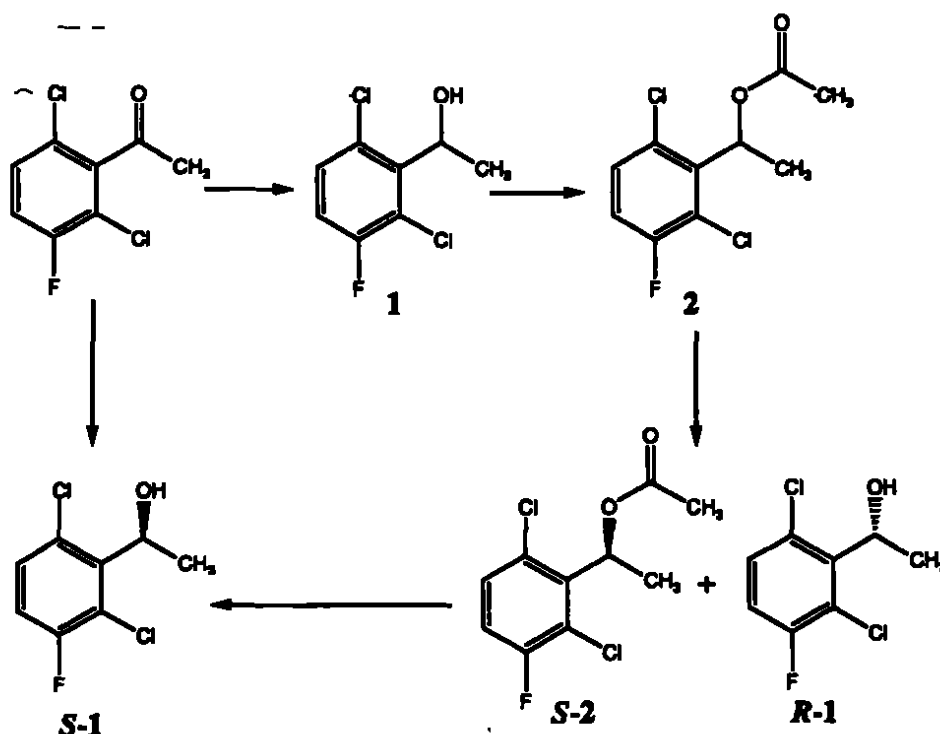
10 **EXAMPLE 1**

Preparation of Optically Active 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol by Combination of Enzymatic Resolution and Chemical Transformation

For illustrative purposes only, the process of the present invention is demonstrated by the following example of biotransformation of a racemic 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate, which

15 biotransformation is represented by Scheme 1.

Scheme 1



Enzymatic resolution of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate (2)

20

The process involved performing four main steps:

1) preparing racemic 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate

2) enzyme screening using commercially available lipases, proteases and esterases;

3) optimizing the reaction conditions such as pH, temperature and the amount of enzyme and substrate; and

25

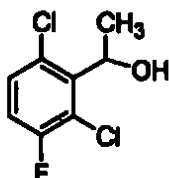
4) maximizing yield of the enzymatic resolution method by developing a procedure for combination of enzymatic hydrolysis, esterification and chemical hydrolysis with inversion.

1) Preparing Racemic 1-(2,6-Dichloro-3-Fluorophenyl)Ethyl Acetate (Compound 2)

-28-

5 Compound 1

1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol

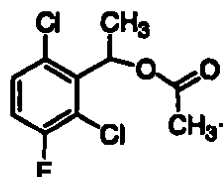


Sodium borohydride (90 mg, 2.4 mmol) was added to a solution of 2',6'-dichloro-3'-fluoro-acetophenone (Aldrich, catalog # 52,294-5) (207 mg, 1 mmol) in 2 mL of anhydrous CH₃OH. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h then was evaporated to give a colorless oil residue. The residue was purified by flash chromatography (eluting with 0→10% EtOAc in hexanes) to give compound 1 as a colorless oil (180 mg; 0.88 mmol; 86.5% yield); MS (APCI) (M-H)⁻ 208; ¹H NMR (400 MHz, chloroform-D) δ ppm 1.84 (d, J=6.82 Hz, 3 H) 3.02 (d, J=9.85 Hz, 1 H) 6.97 - 7.07 (m, 1 H) 7.19 - 7.33 (m, 1 H).

15

Compound 2

1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate



Acetic anhydride (1.42 mL, 15 mmol) and pyridine (1.7 mL, 21 mmol) were added sequentially to a solution of compound 1 (2.2 g, 10.5 mmol) in 20 mL of CH₂Cl₂. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12h and then evaporated to give a yellowish oil residue. The residue was purified by flash chromatography (eluting with 7→9% EtOAc in hexanes) to give compound 2 as a colorless oil (2.26 g; 9.0 mmol; 85.6% yield); ¹H NMR (400 MHz, chloroform-D) δ ppm 1.88 (d, J=6.82 Hz, 3 H) 2.31 (s, 3 H) 6.62 (q, J=6.82 Hz, 1 H) 7.25 (t, J=8.46 Hz, 1 H) 7.49 (dd, J=8.84, 5.05 Hz, 1 H)

25

2) Enzyme Screening

The most suitable catalyst for the kinetic resolution of racemic 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate (compound 2) was identified after screening a collection of commercially available hydrolases. A general enzyme screening method was used to screen 94 commercially available enzymes represented in Table 1.

30

5

Table 1

Blotransformations Group Enzyme Screening Kit (G3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	PGRD9	PGRD17	PGRD26	PGRD33	PGRD41	PGRD48	PGRD55	PGRD62	PGRD69	PGRD76	PGRD83
B	Blank	PGRD10	PGRD18	PGRD28	PGRD34	PGRD42	PGRD49	PGRD56	PGRD63	PGRD70	PGRD77	PGRD84
C	PGRD3	PGRD11	PGRD19	PGRD27	PGRD35	PGRD43	PGRD50	PGRD57	PGRD64	PGRD71	PGRD78	PGRD85
D	PGRD4	PGRD12	PGRD20	PGRD29	PGRD36	PGRD44	PGRD51	PGRD58	PGRD65	PGRD72	PGRD79	PGRD86
E	PGRD5	PGRD13	PGRD21	PGRD30	PGRD37	PGRD45	PGRD52	PGRD59	PGRD66	PGRD73	PGRD80	PGRD87
F	PGRD6	PGRD14	PGRD22	PGRD31	PGRD38	PGRD46	PGRD53	PGRD60	PGRD67	PGRD74	PGRD81	PGRD88
G	PGRD7	PGRD15	PGRD23	PGRD32	PGRD39	PGRD47	PGRD54	PGRD61	PGRD68	PGRD75	PGRD82	PGRD89
H	PGRD8	PGRD16	PGRD24	PGRD32	PGRD40	PGRD48	PGRD55	PGRD62	PGRD69	PGRD76	PGRD83	PGRD90

PGRD #	Enzyme	Supplier Code
1	Blank [Buffer]	Blank
2	Blank [ACN]	Blank
3	Porcine Pancreatic Lipase	Altus03
4	CALA, Iyo.	Altus11
5	Candida lipolytica Lipase	Altus12
6	CALB, Iyo.	Altus13
7	Geotrichum candidum Lipase	Altus28
8	Pseudomonas aroginosa Lipase	Altus50
9	Aspergillus niger Lipase	Amano Lipase A
10	Pseudomonas cepacia Lipase	Amano Lipase AH
11	Pseudomo.fluorescens Lipase	Amano Lipase AK
12	Candida rugosa Lipase	Amano Lipase AY
13	Rhizopus delemar Lipase	Amano Lipase D
14	Rhizopus oryzae Lipase	Amano Lipase F
15	Penicillium camembertii Lipase	Amano Lipase G
16	Mucor javanicus Lipase	Amano Lipase M
17	Pseudomonas cepacia Lipase	Amano Lipase PS
18	Penicillium roqueforti Lipase	Amano Lipase R
19	Aspergillus sp. Protease	BioCatalytics101
20	Pseudomonas sp. Lipase	BioCatalytics103
21	Fungal Lipase	BioCatalytics105
22	Micorbial, Iyo. Lipase	BioCatalytics108
23	CALB, Iyo.	BioCatalytics110
24	Candida sp., Iyo	BioCatalytics111
25	CALA, Iyo.	BioCatalytics112
26	Thermomyces sp Lipase	BioCatalytics115
27	Alcalignes sp., Iyo. Lipase	BioCatalytics117
28	Chromobacterium viscosum Lipase	Altus 26

47

-28-

PGRD #	Enzyme	Supplier Code
29	CalB, L2 Sol	Chirazyme L2 Sol
30	Candida utilis Lipase	Fluka6
31	Rhizopus niveus Lipase	Sigma L8
32	Pseudomonas species Lipoprotein Lipase	Sigma L13
33	Thermomucor lanuginosus Lipase	Sigma L9 Lipolase
34	Thermomucor lanuginosus Lipase	Sigma L10 Novo871
35	Rhizomucor miehei Lipase	Sigma L6 Palatase
36	Pseudomonas species Lipase	Sigma L14 Type XIII
37	Wheat Germ Lipase	Sigma L11
38	Rhizopus arrhizus Lipase	Sigma L7 Type XI
39	Pancreatic Lipase 250	Valley Research V1
40	Trypsin Protease	Altus33
41	Chymopapain Protease	Altus38
42	Bromelain Protease	Altus40
43	Aspergillus niger Protease	Altus41
44	Aspergillus oryzae Protease	Altus42
45	Penicillium species Protease	Altus43
46	Aspergillus sp. Protease	Altus45
47	Renin Calf Stomach protease	Sigma P24
48	Subtilisin Carlsberg	Altus10
49	Bacillus lentus Protease	Altus53
50	Aspergillus niger Protease	Amano Acid Protease A
51	Rhizopus niveus Protease	Amano Acid Protease II
52	Rhizopus niveus Protease	Amano Newlase F
53	Rhizopus oryzae Protease	Amano Peptidase R
54	Bacillus subtilis Protease	Amano Proteather FGF
55	Aspergillus oryzae Protease	Amano Protease A
56	Aspergillus oryzae Protease	Amano Protease M
57	Bacillus subtilis Protease	Amano Protease N
58	Aspergillus melleus	Amano Protease P
59	Bacillus stearothermophilus Protease	Amano Protease SG
60	Pig Liver Esterase, Iyo	BioCat Chirazyme E1
61	Pig Liver Esterase, Iyo	BioCat Chirazyme E2
62	Streptomyces sp. Proteases	BioCatalytics118
63	Tritirachium album Protease	Fluka P6 Proteinase K
64	Bovine Pancreas Protease	Sigma P18 alphachymotrypsin I
65	Streptomyces griseus Protease	Sigma P16 Bacterial

PGRD #	Enzyme	Supplier Code
66	Bovine Pancreas Protease	Sigma P21 Betachymotrypsin
67	Clostridium histolyticum Protease	Sigma P13 Clostripain
68	Bovine Intestine Protease	Sigma P17 Enteropeptidase
69	Porcine Intestine Protease	Sigma P25 Enteropeptidase
70	Bacillus species Protease	Sigma P8 Esperase
71	Aspergillus oryzae Protease	Sigma P1 Flavourzyme
72	Bacillus amyloliquefaciens Protease	Sigma P5 Neutrase
73	Canca papaya Protease	Sigma P12 Papain
74	Bacillus thermoproteolyticus rokko	Sigma P10 Protease
75	Pyrococcus furiosus Protease	Sigma P14 Protease S
76	Bacillus species Protease	Sigma P9 Savinase
77	Bovine Pancreas Protease	Sigma P19 Type 1 (crude)
78	Bacillus polymyxa Protease	Sigma P7 Type IX
79	Bacillus licheniformis Protease	Sigma P6 Type VIII
80	Aspergillus saltol Protease	Sigma P3 Type XIII
81	Aspergillus sojae Protease	Sigma P4 Type XIX
82	Aspergillus oryzae Protease	Sigma P2 Type XXIII
83	Bacterial Protease	Sigma P11 Type XXIV
84	Rhizopus species newlase	Sigma15 Newlase
85	Valdase FP Conc.	Valley05
86	Bromellan Conc	Valley10
87	Acylase from Aspergillus Sp.	Amano Am1
88	Porcine kidney Acylase	Sigma A-S2 Acylase I
89	Penicilin G Acylase	Altus06
90	Esterase from Mucor Melhei	Fluka
91	Candida rugosa Esterase	Altus31
92	Porcine Pancreatic Elastase	Altus35
93	Cholesterol Esterase	BioCatalytics
94	PLE - Ammon. Sulfate	BioCatalytics 123
95	Rabbit Liver Esterase	Sigma ES2
96	Cholesterol Esterase Pseudomonas flu.	Sigma ES4

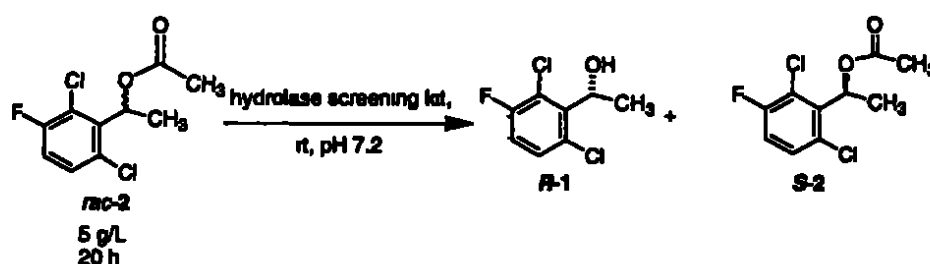
5

After initial screening using 5 % substrate load in 100 mM potassium phosphate buffer at pH 7.2, several hydrolases were identified as hits for the enzymatic hydrolysis of the racemic alcohol ester 2 to alcohol R-1 (Scheme 2).

13

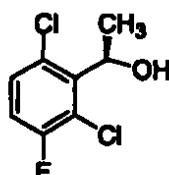
-30-

5 Scheme 2



Compound R-1

(1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol

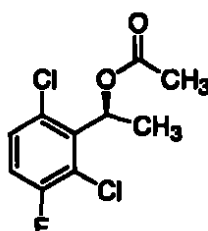


10

Compound R-1 was purified from compound S-2 by flash chromatography (eluting with 15→17% EtOAc in hexanes) to give compound R-1 as a colorless oil (92.7 mg; 0.45 mmol).

Compound S-2

15 (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate



Compound S-2 was purified from compound R-1 by flash chromatography (eluting with 9→10% EtOAc in hexanes) to give compound S-2 as a colorless oil (185.9 mg; 0.74 mmol).

As shown in Table 2, several enzymes showed activity towards 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate (2). The analysis of E values revealed that five of those enzymes showed good enantioselectivity of E value greater than 100. Both lipase from *Rhizopus delemar* and pig liver esterase (PLE) displayed E values >150. However, PLE showed the highest reactivity towards (R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate ((R)-2).

20

44

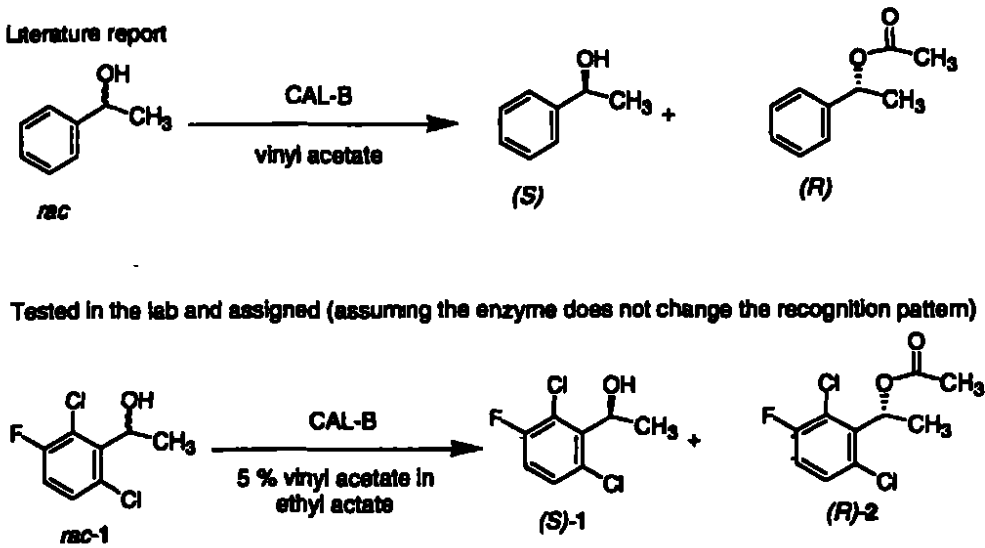
5

Table 2

Enzymes	E value	Reactivity
Selective for hydrolysis of (R)-acetate		
<i>Candida Antarctica</i> lipase B (CAL-B), pig liver esterase (PLE), <i>Rhizopus delemar</i> lipase, Porcine Kidney acylase, cholesterol esterase	High (>100)	High
Bovine intestinal protease, Sigma protease P6 type VIII, <i>Candida rugosa</i> lipase		Low
<i>Rhizopus oryzae</i> lipase, <i>Penicillium camemberti</i> lipase, <i>Pseudomonas</i> sp. Lipase, <i>Thermomyces</i> sp. Lipase, <i>Alcaligenes</i> sp. Lipase, <i>Chromobacterium viscosum</i> lipase, <i>Rhizomucor miehei</i> lipase, <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase, wheat germ lipase, Bromelain protease, <i>Aspergillus niger</i> protease, <i>Rhizopus niveus</i> protease, <i>Aspergillus saitoi</i> protease, acylase from <i>Aspergillus</i> sp.	Low (<20)	Low
Selective for hydrolysis of (S)-acetate		
<i>Candida Antarctica</i> lipase A (CAL-A), Subtilisin Carlsberg (protease from <i>Bacillus licheniformis</i>), <i>Rhizopus oryzae</i> protease	Low (<10)	Low
<i>Rhizopus delemar</i> lipase		High

The absolute configuration of alcohol (1) generated from the PLE hydrolysis was initially assigned by comparison with a known reaction of a similar substrate as shown at Scheme 3 and described in Bouzermi, N. et al, *Tetrahedron Letters*, 2004, pp. 627-630.

10 Scheme 3



5

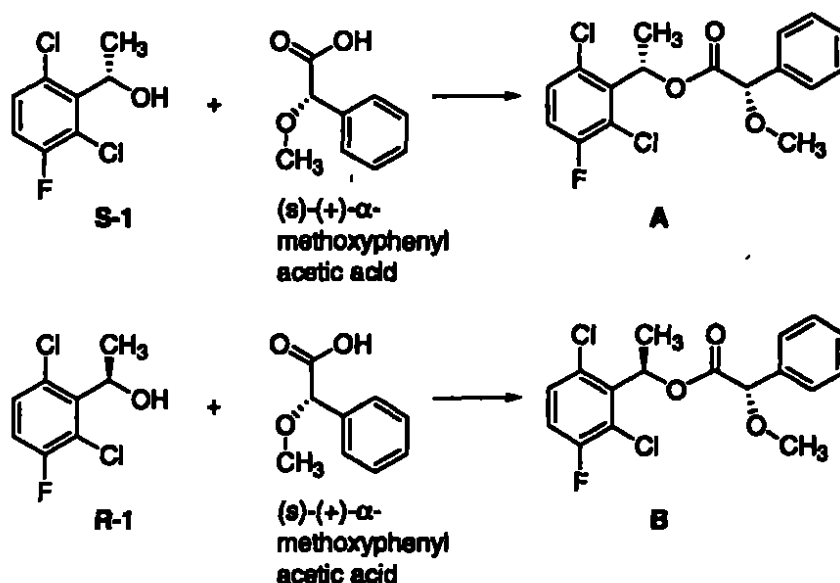
As shown at Scheme 3, the enzymatic acylation of 1-phenylethanol using CAL-B produced the *R*-enantiomer of 1-phenylethyl acetate leaving the unreacted *S*-enantiomer of 1-phenylethanol (Bouzemi, N. et al, *Tetrahedron Letters*, 2004, pp. 627-630). One can assume that when CAL-B is reacted with *rac*-1, the substrate recognition should be the same; accordingly, the obtained ester product was assigned as *R*-enantiomer.

10

When compared with the compound obtained in the enzymatic hydrolysis of *rac*-1 with PLE (opposite reaction), the *R* isomer of the alcohol was observed, clearly coming from the hydrolysis of the *R*-acetate.

15

A direct determination of the absolute configuration of alcohol (1) generated from the PLE hydrolysis product can be based on the NMR determination of the diastereomer produced from the Mosher's esters.



20

Compound A and compound B were synthesized using literature reported procedures in *Tetrahedron: Asymmetry* 2002, vol. 13, p. 2283; *Tetrahedron Lett.* 1988, vol. 29, p. 6211. These two compounds are subjected for ^1H -NMR experiments and the chemical shifts of the methyl groups of both compound A and compound B are compared to determine that compound A has the "*S*" configuration and compound "B" has the "*R*" configuration.

25

Synthesis of compound A: DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) (1.1 mmol) was added to a solution of (S)-(+)- α -methoxyphenylacetic acid (1 mmol) in 5 mL of anhydrous THF. The reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature under nitrogen atmosphere. Compound S-1 (1 mmol) and DMAP (4-dimethylaminopyridine) (0.2 mmol) were added sequentially to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 36 h. The mixture was evaporated, triturated in methanol, filtered, and concentrated to get a residue. The residue was purified by HPLC to give compound

30

A.

Synthesis of compound B: DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) (1.1 mmol) was added to a solution of (S)-(+)- α -methoxyphenylacetic acid (1 mmol) in 5 mL of anhydrous THF. The reaction mixture

-33-

5 was stirred for 15 min at room temperature under nitrogen atmosphere. Compound R-1 (1 mmol) and DMAP (4-dimethylaminopyridine) (0.2 mmol) were added sequentially to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 36 h. The mixture was evaporated, triturated in methanol, filtered, and concentrated to get a residue. The residue was purified by HPLC to give compound B.

10

3) Optimizing the Reaction Conditions Using PLE-AS

PLE is an enzyme produced by Roche and sold through Biocatalytics Inc as a crude esterase preparation from pig liver, commonly known as PLE-AS (purchased from Biocatalytics as ICR-123, sold as an ammonium sulfate suspension). The enzyme is classified in the CAS registry as a "carboxylic-ester hydrolase, CAS no. 9016-18-6". The corresponding enzyme classification number is EC 3.1.1.1. The enzyme is known to have broad substrate specificity towards the hydrolysis of a wide range of esters. The lipase activity is determined using a method based on hydrolysis of ethylbutyrate in a pH titrator. 1 LU (lipase unit) is the amount of enzyme which liberates 1 μ mol titratable butyric acid per minute at 22 °C, pH 8.2. The preparation reported herein (PLE-AS, as a suspension) is usually shipped as an opaque brown-green liquid with a declared activity of > 45 LU/mg (protein content around 40 mg/mL).

20

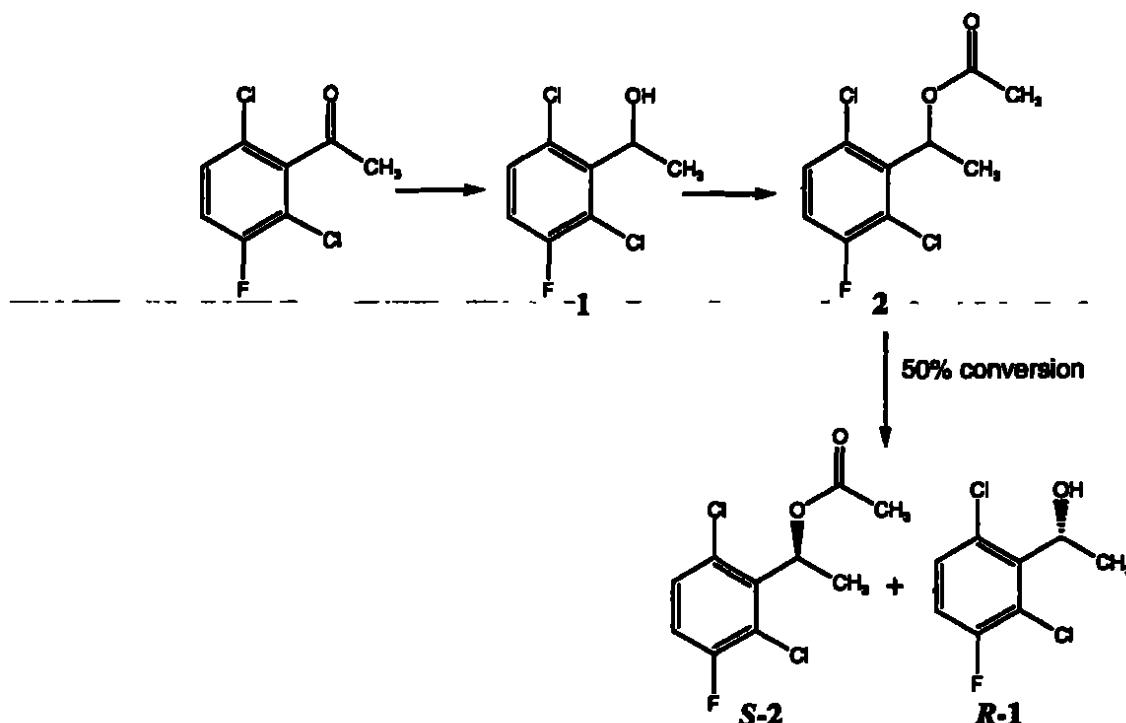
The main parameters optimized in this reaction were substrate and enzyme concentrations, pH, and type of buffer. Most of the experiments were performed using the liquid form of the enzyme commercially available as PLE-AS. The effect of the pH on this reaction was not very critical. A reasonable range of pH to perform the reaction includes pH 6-9 with optimal results at pH 8.0. Most optimization experiments were then performed at room temperature. Buffers were tested: Tris, phosphate and calcium acetate. The reaction can be performed in the three buffers with very similar results in the range of 10-100 mM concentrations. Other buffers that can be used to carry out the reaction include 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES), 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), N-tris (hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES), tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIZMA), N-tris(hydroxymethyl)methylglycine (TRICINE), N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine (BICINE), N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS), or any other buffer with pKa values between 6 and 9. Normal stir rates were used in all experiments (500-1000 rpm). It was found that 5-10 % (v/v) enzyme content could efficiently catalyze the enzymatic reaction nearly as efficient as 20 %. Pre-mixing of enzyme and buffer followed by addition of substrate and strong stirring was found to be beneficial to perform the reaction at minimum concentrations. Using those optimized conditions for enzyme loads, substrate loads from 0.2-2 M were tested and 1-2 M concentrations were found to afford close to 50 % conversion within 24 h. Other forms of the enzyme not commercially available could also be used, those include immobilized on solid support (such as ceramic, celite, Eupergit, acrylic beads, etc), cross-linked enzyme crystals (CLECs), or cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), ammonium sulfate pellets, or any other form in which activity and enantioselectivity can be preserved or enhanced.

40

Large-scale preparation of compounds R-1 and S-2 using pig liver esterase resolution of racemic 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate (2) was performed according to Scheme 4.

-34-

5 Scheme 4



To a 5 L Reactor equipped with a pH electrode, an overhead stirrer and a base addition line was added the PLE-AS solution (0.125L) and 2.17 L of potassium phosphate buffer solution. A 718 Stat

10 Titrimetrohm pH titrator (Brinkman Instruments, Inc) was used to perform the reaction. The potassium phosphate buffer solution was prepared by mixing 2.17 L of water, 15.6 mL of 1M K_2HPO_4 solution and 6.2 mL of KH_2PO_4 .

Then, racemic 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethyl acetate (2) (250 g, 1 mol) was added. The suspension was then stirred at room temperature for 22 h. The pH of the solution was maintained at 7.0

15 by adding 2N NaOH. Reaction was followed by RP-HPLC looking at both conversion and % ee of the product, and stopped after 51-52 % starting material had been consumed (~240 mL of base added).

After reaction completion, methyl-tertbutyl ether (MTBE) (900 mL) was added, and the mixture stirred for 5 min. The resulting emulsion was passed through a celite filter pad and then transferred to a separatory funnel/extractor. This stage includes slurring celite with deionized water and then pouring in a

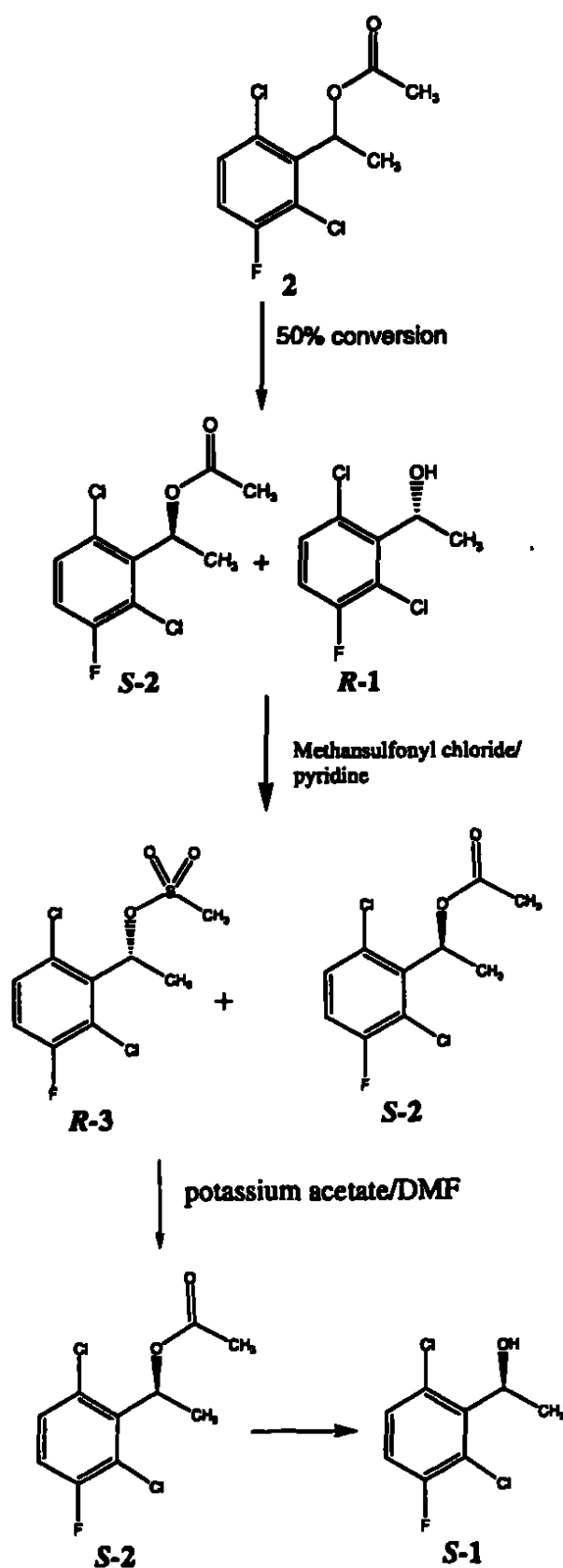
20 Buchner funnel prepared the celite pad. Water filtrate was discarded before passing the enzyme emulsion. After the layers were separated, the aqueous layer was extracted two more times with 900 mL of MTBE each. The combined MTBE layers were dried with Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to afford 242 g of crude alcohol and acetate mixture.

25 4) Maximizing Yield of the Enzymatic Resolution Method by Developing a Procedure for Combination of Enzymatic Hydrolysis, Esterification and Chemical Hydrolysis with Inversion

Once the enzymatic kinetic resolution was developed, chemical conversion of the "R-1" alcohol to the "S-2" acetate was explored. The process was performed according to Scheme 5.

-35-

5 Scheme 5



-36-

5 To a 50 mL jacketed flask equipped with a pH electrode, an overhead stirrer and a base addition line (1M NaOH), was added 1.2 ml of 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 0.13 ml of PLE AS suspension. Then, compound 2 (0.13 g, 0.5 mmol, 1.00 eq) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at room temperature for 20 h; maintaining the pH of the reaction constant at 7.0 using 1 M NaOH. Both the conversion and ee's of the reaction was monitored by RP-HPLC, and stopped after 50% starting material was consumed (approximately 17 hours under these conditions). The mixture was then extracted three times with 10 mL of ethyl acetate to recover both ester and alcohol as a mixture of R-1 and S-2.

15 Methanesulfonyl chloride (0.06 mL, 0.6 mmol) was added to a solution of a mixture of R-1 and S-2 (0.48 mmol) in 4 mL of pyridine under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h then evaporated to obtain an oil. Water (20 mL) was added to the mixture and then EtOAc (20 mL x 2) was added to extract the aqueous solution. The organic layers were combined, dried, filtered, and evaporated to give a mixture of R-3 and S-2. This mixture was used in the next step reaction without further purification. ¹H NMR (400 MHz, chloroform-D) δ ppm 1.66 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) 1.84 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) 2.09 (s, 3 H) 2.92 (s, 3 H) 6.39 (q, $J=7.0$ Hz, 1 H) 6.48 (q, $J=6.8$ Hz, 1 H) 6.98 - 7.07 (m, 1 H) 7.07 - 7.17 (m, 1 H) 7.23 - 7.30 (m, 1 H) 7.34 (dd, $J=8.8, 4.80$ Hz, 1 H).

20 Potassium acetate (0.027 g, 0.26 mmol) was added to a solution of a mixture of R-3 and S-2 (0.48 mmol) in 4 mL of DMF under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was heated to 100° C for 12 h. Water (20 mL) was added to the reaction mixture and EtOAc (20 mL x 2) was added to extract the aqueous solution. The combined organic layer was dried, filtered, and evaporated to give an oil of S-2 (72 mg, 61% yield in two steps). Chirality ee: 97.6%. ¹H NMR (400 MHz, chloroform-D) δ ppm 1.66 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) 2.09 (s, 3 H) 6.39 (q, $J=6.8$ Hz, 1 H) 7.02 (t, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.22 - 7.30 (m, 1 H).

25 Sodium methoxide (19 mmol; 0.5 M in methanol) was added slowly to compound S-2 (4.64 g, 18.8 mmol) under a nitrogen atmosphere at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 hr. The solvent was evaporated and H₂O (100 mL) was added. The cooled reaction mixture was neutralized with sodium acetate-acetic acid buffer solution to pH 7. Ethyl acetate (100 mL x 2) was added to extract the aqueous solution. The combined organic layers was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to obtain S-1 a white solid (4.36 g, 94.9% yield); SFC-MS: 97% ee. ¹H NMR (400 MHz, chloroform-D) δ ppm 1.65 (d, $J=6.8$ Hz, 3 H) 5.58 (q, $J=6.9$ Hz, 1 H) 6.96 - 7.10 (m, 1 H) 7.22 - 7.36 (m, 1 H)

35

EXAMPLE 2

Enantioselective Bio-Reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone

The current process development was approached using whole cell catalyzed reactions as well as commercially available enzymes. The procedure involved performing three main steps:

40 1) screening of an internal whole cell (or isolated enzyme) collection containing mostly yeast and fungal strains (commercially available alcohol dehydrogenases and ketone reductases);

2) performing reaction optimization on pH, temperature and the amount of enzyme and substrate;

3) developing a procedure for the recycling of biocatalyst.

5

Whole cell screening

The screening for strains capable of doing the enantioselective reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone was carried out as follows. Microbial strains were grown from frozen stocks in a 96-well plate (5 μ L/well). 200 μ L of sterile YM media (Difco media 271120) was inoculated in each well. All strains were grown at 28° C and 250 rpm on a rotary shaker. After 2 days, substrate was added from a 10 % stock solution in ethanol to reach 1 mg/mL in each well. The plates were then shaken at the same speed and temperature and the reactions analyzed after 2-7 days. The reactions were analyzed by HPLC using a non-chiral column.

One hundred eighty eight different microbial strains shown in Table 3 were distributed into 96-well plates and tested at substrate concentrations no greater than 1 mg/mL as described above. Thirty different strains belonging to *Rhodotorula*, *Neurospora*, *Rhodosporium*, *Aerobasidium*, and *Candida* species were found showing the desired activity. All the strains displayed S selectivity. Those strains were then re-screened and yeasts UC2387 belonging to *Rhodotorula* species was chosen for the preparation of S-1 at larger scales.

20

Table 3			
ATCC Number or other	Strain name	ATCC Number or other	Strain name
ATCC 18101	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC2401	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 18818	<i>Rhodotorula diffluens</i>	UC2395	<i>Candida sp.</i>
ATCC 14023	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UC2486	<i>Rhodosporium dibovatum</i>
ATCC 18813	<i>Rhodotorula buffonii</i>	UC2461	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 20804	<i>Rhodotorula graminis</i>	UC2454	<i>Rhodotorula glutinis</i>
ATCC 10656	<i>Cryptococcus flavus</i>	UC2447	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 24010	<i>Rhodotorula javanica</i>	UC2431	<i>Sporobolomyces sp.</i>
ATCC 28954	<i>Rhodotorula bacarum</i>	UC17612	Unknown yeast
ATCC 28322	<i>Rhodotorula sonckii</i>	UC17613	Unknown yeast
ATCC 20837	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC2472	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 20254	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC2471	<i>Rhodotorula minuta</i>
ATCC 28135	<i>Rhodotorula hordeae</i>	UC2468	<i>Rhodotorula graminis</i>
ATCC 22078	<i>Rhodotorula araucariae</i>	UC17483	Unknown yeast
ATCC 10659	<i>Rhodotorula glutinis</i>	UC16748	Unknown yeast
ATCC 58914	<i>Rhodotorula futronensis</i>	UC16508	Unknown yeast
ATCC 52903	<i>Rhodotorula phyloplana</i>	UC4229	<i>Rhodosporidium sphacrocarpum</i>
ATCC 52902	<i>Rhodotorula hinnaeae</i>	UC4235	<i>Rhodosporidium sphacrocarpum</i>
ATCC 52907	<i>Rhodotorula armeniacae</i>	UC4246	<i>Hansenula anomala</i>
ATCC 42713	<i>Rhodotorula acuta</i>	UC4254	<i>Candida norvegensis</i>

Table 3			
ATCC Number or other	Strain name	ATCC Number or other	Strain name
ATCC 32034	<i>Rhodotorula pustula</i>	UC4265	<i>Candida zeylanoides</i>
ATCC 10658	<i>Rhodotorula minuta</i>	UC4281	<i>Cryptococcus albidus</i>
ATCC 42552	<i>Rhodotorula matritensis</i>	UC4247	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
ATCC 28983	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC4255	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 76737	<i>Rhodotorula ferulica</i>	UC4266	<i>Candida rugosa</i>
ATCC 90775	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	UC4282	<i>Debaryomyces hansenii</i>
ATCC 10855	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	UC4248	<i>Candida parapsilosis</i>
ATCC 52823	<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	UC4256	<i>Debaryomyces hansenii</i>
ATCC 90391	<i>Rhodotorula lactosa</i>	UC4238	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATCC 32764	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	UC4272	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC 32768	<i>Rhodotorula graminis</i>	UC4288	<i>Trichosporon cutaneum</i>
ATCC 52902	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	UC4242	<i>Cryptococcus laurentii</i>
ATCC 13546	<i>Cryptococcus laurentii</i>	UC4250	<i>Candida tenuis</i>
ATCC 16727	<i>Rhodotorula graminis</i>	UC4259	<i>Candida sp.</i>
ATCC 18176	<i>Rhodotorula lactosa</i>	UC4275	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 16182	<i>Cystofilobasidium infirmum</i>	UC4289	<i>Candida raghii</i>
ATCC 886	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC4244	<i>Rhodospiridium sphaerocarum</i>
ATCC 22946	<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	UC4253	<i>Candida polymorpha</i>
ATCC 22993	<i>Rhodotorula ingens</i>	UC4263	<i>Rhodotorula plimaneae</i>
ATCC 22875	<i>Rhodotorula hylophila</i>	UC4277	<i>Rhodotorula glutinis</i>
ATCC 18809	<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	UC4294	<i>Candida norvegensis</i>
ATCC 34886	<i>Rhodotorula muscorum</i>	UC 1787	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 44533	<i>Rhodotorula pilati</i>	UC2387	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 24121	<i>Rhodotorula auriculariae</i>	UC1827	<i>Bullera sp.</i>
ATCC 18820	<i>Rhodotorula foliorum</i>	UC1846	<i>Geotrichum sp.</i>
ATCC 28485	<i>Pichia pastoris</i>	UC1281	<i>Candida sp.</i>
ATCC 17697	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	UC1763	<i>Bullera sp.</i>
ATCC 999	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	UC1765	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 35411	<i>Lactobacillus kefir</i>	UC1247	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 27337	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	UC1256	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 26012	<i>Hansenula polymorpha</i>	UC1264	<i>Candida sp.</i>
ATCC 17798	<i>Chlostridium ps.</i>	UC1268	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 25619	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	UC1276	<i>Rhodotorula sp.</i>

Table 3			
ATCC Number or other	Strain name	ATCC Number or other	Strain name
ATCC 23973	<i>Pseudomonas putida</i>	UC1202	<i>Rhodospordium sp</i>
ATCC 12278	<i>Aspergillus niveus</i>	UC1209	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 10436	<i>Penicillium decumbens</i>	UC1213	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 66815	<i>Thorulaspora sp.</i>	UC1235	<i>Candida sp.</i>
ATCC7159	<i>Beauveria sulfurences</i>	UC1240	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 21766	<i>Corynebacterium dyoxidans</i>	UC1184	<i>Candida sp.</i>
ATCC 33305	<i>Acinetobacter sp.</i>	UC1779	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 1207a	<i>Mucor circinelloides</i>	UC1185	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 22792	<i>Dipodascus uninucleatus</i>	UC1190	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 12875	<i>Rhodococcus fascians</i>	UC1192	<i>Rhodospordium sp</i>
ATCC 7924	<i>Mucor racemosum</i>	UC1195	<i>Candida sp.</i>
ATCC 11048	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	UC5113	<i>Aerobasidium mansonii</i>
ATCC 9692	<i>Mucor rammanianus</i>	UC5098	<i>Cryptococcus laurentii var laurentii</i>
ATCC 29670	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	UC5084	<i>Cryptococcus laurentii var laurentii</i>
NRRL Y-164	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	UC4317	<i>Candida tenuis</i>
ATCC 10613	<i>S. uvarum</i>	UC4310	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC35047	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	UC5110	<i>Candida guilliermondii</i>
ATCC 10788	<i>Rhodotorula toruloides</i>	UC5093	<i>Cryptococcus laurentii var laurentii</i>
ATCC 35091	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	UC4327	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 8527	<i>Clostridium kluyveri-anaerobic</i>	UC4316	<i>Candida curvata</i>
ATCC 14692	<i>Neurospora crassa</i>	UC4309	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 16617	<i>Yarrowia lipolytica</i>	UC5103	<i>Candida sp.</i>
ATCC 21684	<i>Rhodococcus sp.</i>	UC5089	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
ATCC 38191	<i>Mortierella ramanniana</i>	UC4324	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 10840	<i>Kloeckera cortici</i>	UC4315	<i>Candida sp.</i>
ATCC 10679	<i>T. variabilis</i>	UC4305	<i>Candida tenuis</i>
ATCC 39213	<i>Pseudomonas putida</i>	UC5101	<i>Matschinkowia buccispinata</i>
ATCC 49097	<i>Bacillus simplex</i>	UC5088	<i>Hansenula anomala</i>
UC 2390	<i>Rhodotorula Sp.</i>	UC4321	<i>Cryptococcus albidus var albidus</i>
UC2387	<i>Rhodotorula Sp.</i>	UC4313	<i>candida lipolytica</i>
UC2386	<i>Rhodotorula minuta</i>	UC4304	<i>Candida tropicalis</i>
UC2385	<i>Cryptococcus sp.</i>	UC5100	<i>Candida norvegensis</i>
UC2371	<i>Candida sp.</i>	UC5087	<i>Candida krusei</i>
UC2419	<i>Candida sp.</i>	UC4319	<i>Torulopsis candida</i>
UC2411	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC4312	<i>Trichosporum cutaneum</i>

53

Table 3			
ATCC Number or other	Strain name	ATCC Number or other	Strain name
UC2405	<i>Debaryomyces sp.</i>	UC4287	<i>Saccharomyces laurentii</i>
UC4272	<i>Unknown yeast</i>	UC4289	<i>Unknown yeast</i>
UC4288	<i>Unknown yeast</i>	UC4244	<i>Unknown yeast</i>
UC4242	<i>Unknown yeast</i>	UC4253	<i>Unknown yeast</i>
UC4250	<i>Unknown yeast</i>	UC4263	<i>Unknown yeast</i>
UC4259	<i>Unknown yeast</i>	UC4277	<i>Unknown yeast</i>
UC4275	<i>Unknown yeast</i>	UC4294	<i>Unknown yeast</i>

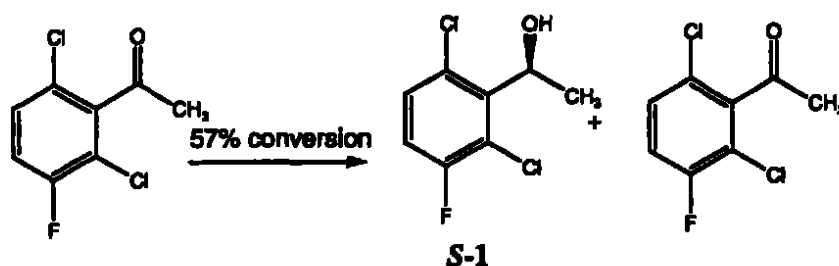
5

Large-Scale Procedure for the Preparation of (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol (S-1) by Reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone Using *Rhodotorula sp.* strain Y2-UC2387

Bio-reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone to (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol (S-1) using *Rhodotorula sp.* strain Y2-UC2387 was performed according to Scheme 6 as follows below

10

Scheme 6



15

A two-stage fermentation procedure was set up where pre-culture (first stage) was grown from fresh inoculum (colony picked from agar plate) in shake flasks for 2 days. The second stage culture was started by adding pre-culture to fresh media (1/50-1/100 dilution) and the resulting culture was grown for 1 day before substrate was added from a 10% ethanol solution. YM media (Difco media 271120) was used for both liquid cultures as well as the agar based plates. For the reduction of 2 g (9.6 mmol) of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone, a 1L preparation was needed. The first stage culture contained 10 mL YM and the whole culture was used to inoculate the second stage culture (1 L). After growing for 3 days, substrate was added neat and reaction stirred for 7 days. Both the conversion of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone to the desired isomer of the alcohol S-1 and ee of S-1 were monitored by RP-HPLC. The reaction was stopped after 57 % conversion was reached when yeast cells were removed by centrifugation at 5,000 rpm. The remaining starting material and the desired product were recovered by extraction (three times with 0.5 volumes of ethyl acetate).

25

6A

-41-

5 Studies on the maximum substrate loads and recycling of yeast cells

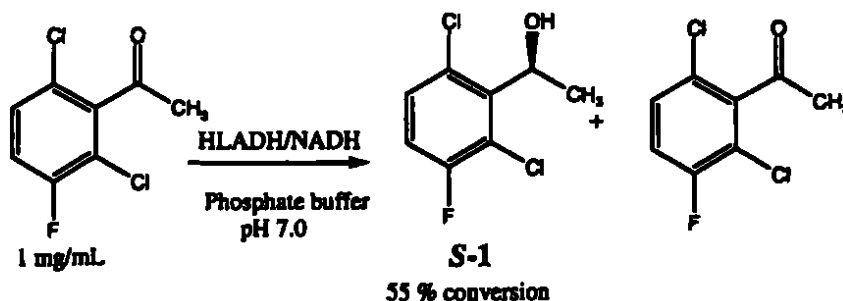
Substrate concentration in the range of 1-20 g/L was tested, and 2.5 g/L chosen because it allowed the best space-time yield (~0.5g/L/d) corresponding to a product formation rate of 0.1 g per gram of microorganism per day. The yields of isolated product are in the range from 50 to 100%. The poor solubility of the precursor in water < 2.5 g/L prevents the use of higher substrate loads. Non ionic XAD resins (produced by Rohm and Hass) known to adsorb organic compounds (according to a paper by D'Arrigo, *et al*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, vol. 8, pp. 2375-2379) could be used for the entrapment of the substrate or product (mostly to provide a slow release of substrate and to avoid toxicity of substrate to cells or enzyme inhibition). This technique allows the use of substrate loads of 20 g/L or higher.

Cells immobilized in calcium alginate according to the procedure by Rothaus, *et al*, *Tetrahedron*, 2002, vol. 58, pp. 7291-93, proved to be a practical solution for the recycling and better use of the catalyst. The entrapped yeast cells were more resistant to mechanical stress and at the same time, significant improvements in the recovery of products were observed. Substrate loads similar to the ones observed with whole cells were also seen.

20 Screening of the Commercially Available Enzymes

The screening for enzymes capable of doing the enantioselective reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone was carried out as follows. 27 different ketone reductases (purchased from Biocatalytics, Inc as a KRED-M27 KIT), as well as 4 alcohol dehydrogenases (horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH), yeast alcohol dehydrogenase, *Thermoanaerobium brockii* alcohol dehydrogenase and *Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase) available from Sigma Aldrich, were tested. The Kred enzyme reactions were performed at 1 mg/mL substrate load and using NADPH as the reducing agent. Alcohol dehydrogenases were tested using both NADH and NADPH. Only horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH) catalyzed the selective reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone to afford (*S*)-1 according to Scheme 7.

30 Scheme 7



HLADH has been previously reported for the reduction of multiple substrates (it acts as an E3 type ADH according to Nakamura, *et al*, *Tetrahedron asymmetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659-2681) following the prelog's rule (Prelog, V, *Pure App. Chem.*, 1964, vol. 9, 119).

Table 4 contains the substrate to enzyme (S:E) ratios evaluated.

55

-42-

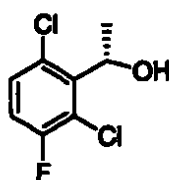
5

Table 4

Ratio	Conversion (%)		
S:E	NADPH	NAD	Rx time(h)
1:1	6	15	18
1:2	13	25	18
1:5	20	41	18
1:10	42	55	64

Compound S-1

(1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol



10

Compound S-1 was purified from the starting material ketone by flash chromatography (eluting with 15→20% EtOAc in hexanes) to give compound S-1 as a colorless oil (229.8 mg; 1.1 mmol); SFC-MS: 100% ee. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.35 (dd, $J=9.0, 4.9$ Hz, 1 H), 7.14 (t, $J=8.6$ Hz, 1 H), 5.61 (q, $J=6.8$ Hz, 1 H), 1.58 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H).

15

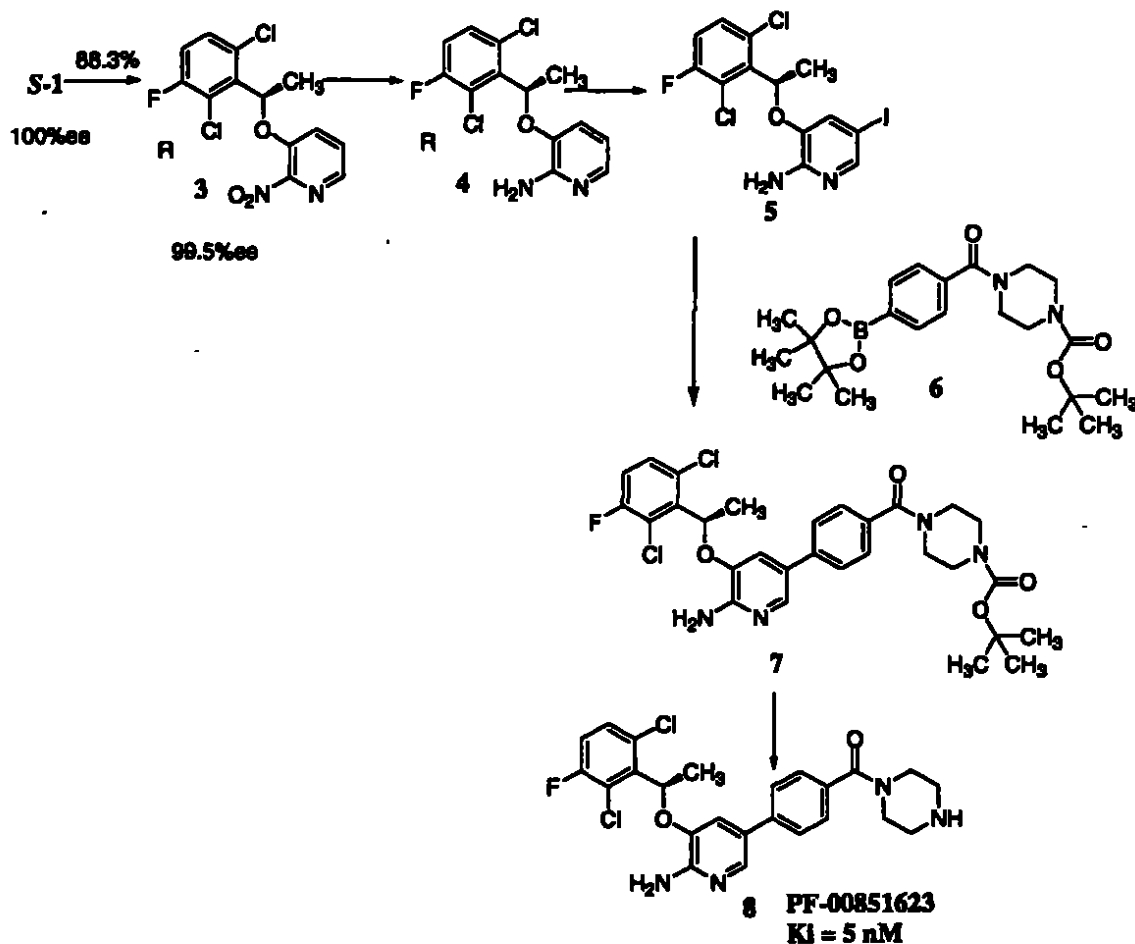
EXAMPLE 3.**Use of (1S)-1-(2,6-Dichloro-3-Fluorophenyl)Ethanol in the Synthesis of Human Hepatocyte Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors**

(1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol was used as an intermediate in chiral synthesis of human hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors according to Scheme 8 and synthetic procedures described below.

20

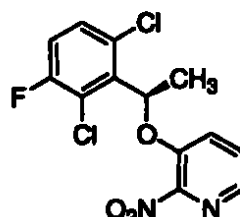
Scheme 8

-43-



5

Compound 3

3-[(1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]-2-nitropyridine

10

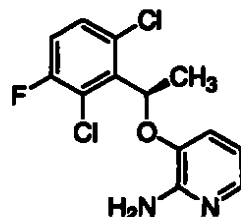
3-Hydroxy-2-nitropyridine (175 mg, 1.21 mmol), triphenylphosphine (440 mg, 1.65 mmol) were added sequentially to a stirred solution of S-1 (229.8 mg, 1.1 mmol) in THF (10 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was maintained at room temperature for 1 h and then diisopropyl azodicarboxylate (0.34 mL, 1.65 mmol) was added at 0° C. The mixture was stirred for an additional 12 h. The reaction mixture was evaporated under vacuum to give an oil. The residue was purified by flash chromatography (eluting with 20→25% EtOAc in hexanes) to give compound 3 as a white solid (321.5 mg; 0.97 mmol; 88.3% yield); MS (APCI) (M+H)⁺ 331; SFC-MS: 99.5% ee. ¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.85 (d, J=6.6 Hz, 3 H) 6.10 (q, J=6.6 Hz, 1 H) 7.04 - 7.13 (m, 1 H) 7.21 (dd, J=8.5, 1.14 Hz, 1 H) 7.30 (dd, J=9.0, 4.9 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.6, 4.6 Hz, 1 H) 8.04 (dd, J=4.6, 1.3 Hz, 1 H).

15

-44-

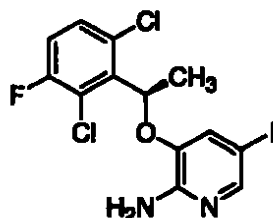
5

Compound 4

3-[(1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]pyridin-2-amine

Iron (365 mg) was added to a stirred solution of compound 3 (321 mg, 0.97 mmol) in a mixture of EtOH (2 mL) and 2M HCl (0.2 mL) at 0° C. The resulting solution was heated to 85° C for 2 h. Celite (0.5 g) was added to the cooled reaction mixture. This mixture was filtered over a bed of celite and evaporated to give compound 4 as a dark oil. MS (APCI) (M+H)⁺ 301. Compound 4 was used in the next step reaction without further purification.

15 Compound 5

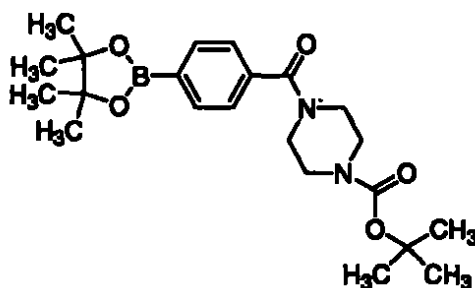
3-[(1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]-5-iodo-pyridin-2-amine

Periodic acid (60 mg, 0.24 mmol), iodine (130 mg, 0.5 mmol), and sulfuric acid (0.03 mL) were added sequentially to a stirred solution of compound 4 (0.97 mmol) in a mixture of acetic acid (3 mL) and H₂O (0.5 mL). The resulting solution was heated to 80° C for 5 h. The cooled reaction mixture was quenched with Na₂SO₃ (80 mg) and basicified with sat. Na₂CO₃ (2 x 100 mL) to pH 7. CH₂Cl₂ (2 x 50 mL) was added to extract the aqueous solution. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, then filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (eluting with 35→40% EtOAc in hexanes) to give compound 5 as a yellow oil (254 mg; 0.6 mmol; 61.6% yield); MS (APCI) (M+H)⁺ 426. ¹H NMR (400 MHz, chloroform-*D*) δ ppm 1.81 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 4.88 (s, 2 H) 5.98 (q, *J*=6.57 Hz, 1 H) 6.96 (d, *J*=1.5 Hz, 1 H) 7.08 (dd, *J*=9.0, 8.0 Hz, 1 H) 7.31 (dd, *J*=8.8, 4.8 Hz, 1 H) 7.78 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H).

Compound 6

30 *tert*-Butyl 4-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoyl]piperazine-1-carboxylate

-45-



5

1,1'-carbonyl-diimidazole (360 mg, 2.2 mmol) was added to a solution of 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoic acid (515 mg, 2 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and then tert-butyl-1-piperazine-carboxylate (390 mg, 2 mmol) was added. The resulting suspension was stirred for 12 h under inert atmosphere. The mixture was poured into H_2O (50 mL) to stir and CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) was added to extract the aqueous solution. The combined organic layers were dried, filtered and concentrated to give a colorless oil residue. The residue was purified by flash chromatography (eluting with 20→25% EtOAc in hexanes) to give compound 6 as a white solid (481 mg; 1.1 mmol; 55.4% yield); MS (APCI) $(\text{M}+\text{H})^+$ 417. ^1H NMR (400 MHz, chloroform- D) δ ppm 1.34 (s, 12 H) 1.45 (s, 9 H) 3.26 - 3.42 (m, 4 H) 3.44 - 3.58 (m, 2 H) 3.66 - 3.89 (m, 2 H) 7.37 (d, $J=8.1$ Hz, 2 H) 7.84 (d, $J=8.1$ Hz, 2 H).

15

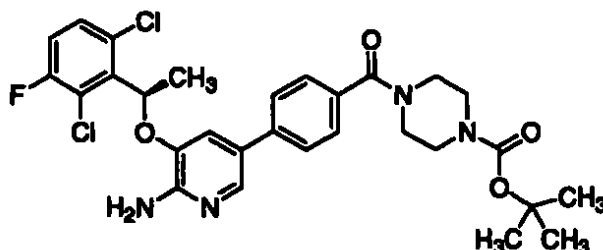
Compound 7

tert-Butyl

4-(4-(6-amino-5-[(1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]pyridin-3-

yl)benzoyl)piperazine-1-carboxylate

20

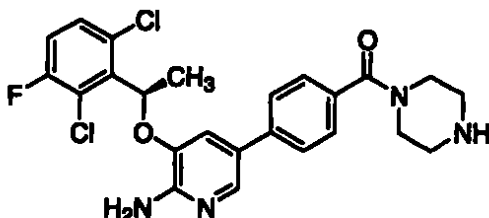


Compound 6 (300 mg, 0.72 mmol) was added to a solution of compound 5 (254 mg, 0.6 mmol) in 7 mL of DME (ethylene glycoldimethyl ether). The mixture was purged with nitrogen several times and then dichlorobis(triphenylphosphino) palladium (II) (50 mg, 0.06 mmol) was added. Sodium carbonate (200 mg, 1.8 mmol) in 1.5 mL of H_2O was added to the reaction mixture and the resulting solution was heated to 85 $^\circ\text{C}$ for 12 h. Water (50 mL) was added to the reaction mixture to quench the reaction. EtOAc (2 x 50 mL) was then added to extract the aqueous solution. The combined EtOAc layer was dried, filtered, and evaporated to give a brown yellow oil residue. The residue was purified by silica gel chromatography (eluting with 75→80% EtOAc in hexanes) to give compound 7 as a white solid (255.5 mg; 0.43 mmol; 72.9% yield); MS (APCI) $(\text{M}+\text{H})^+$ 589. ^1H NMR (400 MHz, chloroform- D) δ ppm 1.45 (s, 9 H) 1.85 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H) 4.92 (s, 2 H) 6.10 (q, $J=6.6$ Hz, 1 H) 6.97 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H) 7.01 - 7.10 (m, 1 H) 7.29 (dd, $J=9.0, 4.9$ Hz, 1 H) 7.36 - 7.42 (m, 3 H) 7.58 - 7.64 (m, 1 H) 7.87 (d, $J=1.5$ Hz, 1 H).

25

30

5 Compound 8

3-[(1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]-5-[4-(piperazin-1-ylcarbonyl)phenyl]-pyridin-2-amine

Hydrochloric acid (1.3 mL, 4.8 mmol) was added to a solution of compound 7 in ethanol (10 mL).

- 10 The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h and then was evaporated under vacuum to give an oil. The residue was purified by flash chromatography (eluting with 25→40% CH₃OH in EtOAc) to give compound 8 as a white solid (180.4 mg; 0.37 mmol; 85.2% yield); MS (APCI) (M+H)⁺ 489; SFC-MS: 100% ee. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 1.88 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 2.92 - 3.21 (m, 4 H) 3.58 - 4.07 (m, 4 H) 6.21 (q, *J*=6.8 Hz, 1 H) 7.02 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.18 - 7.27 (m, 1 H) 7.41 - 7.45 (m, 1 H) 7.48 (s, 4 H) 7.78 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H). Anal. Calcd for C₂₄H₂₃Cl₂FN₄O₂·2 HCl·1.25 H₂O C: 49.29, H: 4.74, N: 9.58. Found C: 49.53, H: 4.82, N: 9.29.
- 15

- While the invention has been illustrated by reference to specific and preferred embodiments, those skilled in the art will recognize that variations and modifications may be made through routine experimentation and practice of the invention. Thus, the invention is intended not to be limited by the foregoing description, but to be defined by the appended claims and their equivalents.
- 20

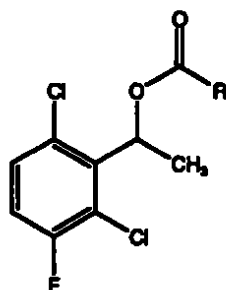
The entire disclosure of patents and patent applications and non-patent publications cited in the present specification is incorporated by reference.

-47-

5 We Claim:

1. (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol that is at least 95% free of (1*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

10 2. A method of separating enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters of formula (I):



15 wherein R is hydrogen, C₁-C₂₀-alkyl, C₃-C₈-cycloalkyl, C₆-C₁₄-aryl, C₇-C₁₅-arylalkyl, C₁-C₂₀-alkoxy, C₁-C₂₀-alkylamino, wherein said hydrocarbon radicals can optionally be monosubstituted or polysubstituted with hydroxyl, formyl, oxy, C₁-C₈-alkoxy, carboxy, mercapto, sulfo, amino, C₁-C₈-alkylamino or nitro or halogen,

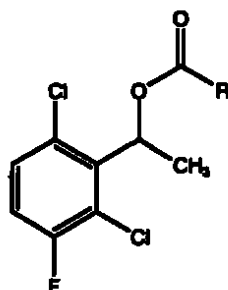
the method comprising the steps of:

20 contacting the 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters of formula (I) with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein only one enantiomer is selectively hydrolyzed to give an optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and an unreacted optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester, and

separating the optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol from the unreacted optically active 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester.

25

3. A method for preparing (1*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol comprising the steps of:
contacting of a mixture of enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters of formula (I):



30

wherein R is hydrogen, C₁-C₂₀-alkyl, C₃-C₈-cycloalkyl, C₆-C₁₄-aryl, C₇-C₁₅-arylalkyl, C₁-C₂₀-alkoxy, C₁-C₂₀-alkylamino, wherein said hydrocarbon radicals can optionally be monosubstituted or

-48-

5 polysubstituted with hydroxyl, formyl, oxy, C₁-C₆ -alkoxy, carboxy, mercapto, sulpho, amino, C₁-C₆ -alkylamino or nitro or halogen,

with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein only (*R*)-enantiomer is selectively hydrolyzed to give a mixture of (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and a (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)-ethanol ester;

10 converting the mixture of (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester to (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol; and
recovering (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

4. The method according to Claim 3, wherein the converting step comprises:

15 a) reacting (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol in the mixture of (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester with an organic sulfonyl halide in an aprotic solvent to form a mixture of an organic sulfonic acid ester of (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester;

20 b) further reacting the organic sulfonic acid ester of (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol in the mixture of the organic sulfonic acid ester of (*R*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester with an alkali metal salt of an aliphatic carboxylic acid in an aprotic solvent to form a mixture of an aliphatic carboxylic acid ester of (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester; and

25 c) transforming the mixture of the aliphatic carboxylic acid ester of (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester into (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

5. The method according to Claim 4, wherein the transforming step c) comprises:

30 solvolyzing the mixture of the aliphatic carboxylic acid ester of (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester in an alcoholic or aqueous solvent in the presence of a basic substance to form (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

6. The method according to Claim 5, wherein in the transforming step c)

35 the mixture of the aliphatic carboxylic acid ester of (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol and the (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester is solvolized in methanol in the presence of sodium methoxide to form (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

7. The method according to Claim 6, wherein:

40 R is methyl;

in the reacting step a) the organic sulfonyl halide is methanesulfonyl chloride, the aprotic solvent is pyridine;

in the reacting step b) the alkali metal salt of aliphatic carboxylic acids is potassium acetate, the aprotic solvent is dimethylformamide.

-48-

5

8. The method according to Claim 3, wherein the biocatalyst is an enzyme selected from the group consisting of Amano D (*R. delamar* lipase), Amano AY (*C. rugosa* lipase), Amano F (*R. oryzae* lipase) and pig liver esterase.

10 9. The method according to Claim 8, wherein the enzyme is used in an amount of 0.1 to 100 parts by weight based on 100 parts by weight of the mixture of enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters.

15 10. The method according to Claim 3, wherein the contacting step of the mixture of enantiomeric 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol esters with the biocatalyst is carried out in an aqueous solution at 0 to 60 °C with maintenance of pH at 4 to 12.

20 11. A method for preparing an optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol comprising the step of reducing 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone by a biocatalyst in an enantioselective manner in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents to give said optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

25 12. The method according to Claim 11, further comprising the step of recovering said optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

13. The method according to either of Claims 11 or 12, wherein said optically active isomer of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol is (1*S*)-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol.

30 14. The method according to any of Claims 11-13, wherein the biocatalyst is an enzyme.

15. The method according to any of Claims 11-14, wherein the enzyme is horse liver alcohol dehydrogenase.

**BIOTRANSFORMACIÓN ENANTIOSELECTIVA PARA LA PREPARACIÓN
DE INTERMEDIOS DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA TIROSINA
QUINASA**

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a procedimientos para preparar estereoisómeros enantioméricamente puros de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que son intermedios útiles en la síntesis de análogos de 2-aminopiridina unidos a éter, enantioméricamente enriquecidos que inhiben potentemente la autofosforilación del receptor de factor de crecimiento de
10 hepatocitos humanos y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer y otros trastornos hiperproliferativos.

Antecedentes de la invención

15 Las estrategias para obtener un enantiómero individual de un compuesto han llegado a ser importantes en el descubrimiento de fármacos debido a que menudo un enantiómero es un fármaco eficaz mientras el otro enantiómero tiene actividad biológica indeseable. De manera ideal, se diseña una síntesis asimétrica para producir solamente el enantiómero deseado. Desafortunadamente, más a menudo que no, una síntesis asimétrica no se
20 puede diseñar o es prohibitivamente cara.

 Aunque 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona se redujo enantioselectivamente a (1R)-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol con una pureza enantiomérica de 96% de exceso enantiomérico (ee) usando un agente reductor preparado a partir de borohidruro de sodio, cloruro de trimetilsililo y
25 una cantidad catalítica de (S)- α,α -difenilpirrolidinametanol (Jiang y col.,

Tetrahedron Lett., 2000, vol. 41, pp. 10281 - 10283), no existe una síntesis química disponible para producir (1S)-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol, que es un intermedio en la síntesis de ciertos análogos de 2-aminopiridina unidos a éter, enantioméricamente enriquecidos que inhiben potentemente la autofosforilación del receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humanos (HGFR o c-MET). Los ejemplos de inhibidores de c-MET (HGFR), su síntesis y uso, se pueden encontrar en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 10/786.610, titulada "Aminoheteroaryl Compounds as Protein Kinase Inhibitors", presentada el 26 de febrero de 2004, y la solicitud internacional correspondiente PCT/US2004/005495 del mismo título, presentada el 26 de febrero de 2004, cuyas descripciones se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad.

Los intentos de los inventores para preparar (1S)-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol con pureza enantioméricamente adecuada mediante reducción quiral de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona usando diferentes reactivos químicos, por ejemplo, complejo (R)-2-metil-CBS-oxazaborolidina/BH₃-dimetilsulfuro (BMS) (*J. Am. Chem. Soc.* 1987, vol. 109, pp. 7925); borohidruro de sodio, cloruro de trimetilsililo y una cantidad catalítica de (S)- α,α -difenilpirrolidinametanol (Jiang y col., *Tetrahedron Lett.*, 2000, vol. 41, pp. 10281 - 10283); complejo oxazaborolidina/BH₃-dimetilsulfuro (BMS) (*J. Org. Chem.* 1993, vol. 58, pp. 2880); y (-)-(B)-clorodiisopinocanfenilborano (DIP-CI) (*Tetrahedron Lett.* 1997, vol. 38, pp. 2641), no tuvieron éxito.

Se sabe que los alcoholes enantioméricamente puros se pueden producir mediante reducción estereoselectiva usando biocatalizadores tales como enzimas o microorganismos. Por ejemplo, la fenilacetaldehído reductasa

de la cepa ST-10 de *Corynebacterium* tiene un intervalo amplio de sustrato y reduce diversas cetonas aromáticas proquirales y β -cetoésteres para producir alcoholes secundarios ópticamente activos con una pureza enantiomérica de más de 98% de exceso enantiomérico (ee). Itoh y col., *Eur. J. Biochem.*, 2002, v. 269, pp. 2394 - 2402. Según una revisión sobre desarrollos recientes en la reducción asimétrica de cetonas con biocatalizadores, por ejemplo, para la reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo, *Klebseilla pneumoniae* IFO 3319 de 450 cepas bacterianas se encontró que proporcionaba el (2R,3S)hidroxiéster correspondiente con > 99% de ee. K. Nakamura y col *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14, 2659 - 2681. La patente de Estados Unidos Nº 5.310.666 describe una cepa de *Rhodotorula rubra*, que reduce pentoxifilina a 100% para producir el S-alcohol. La patente de Estados Unidos 6.451.587 proporciona procedimientos de reducción asimétrica microbiana para preparar el alcohol (R)-2-cloro-1-[6-(2,5-dimetilpirrol-1-il)piridin-3-il]etanol a partir de la cetona 2-cloro-1-[6-(2,5-dimetilpirrol-1-il)piridin-3-il]etanona. Las patentes de Estados Unidos Números 6.642.387 y 6.515.134 describen la preparación de ciertos derivados de hidroxietilpiridina ópticamente activos que usan reducción microbiana. La patente de Estados Unidos Nº 5.391.495 describe la reducción estereoselectiva de ciertos compuestos de sulfonamida que contienen ceto para formar los compuestos correspondientes que contienen grupo hidroxilo utilizando un microorganismo o una enzima capaz de catalizar la reducción. Los biocatalizadores de células enteras se usaron para reducir 3,4- diclorofenacilcloruro para proporcionar la (R) o (S)-clorohidrina con altos rendimientos y de buenos a altos ee. Barbieri y col., *Tetrahedron Asymmetry*, 1999, vol. 10, pp. 3931 - 3937. Se obtuvo 1-feniletilalcohol no

racémico de configuración R y S y de alta pureza enantiomérica mediante bio -
reducción de acetofenona en ambiente de hexano anhidro no acuoso.
Zymanczyk - Duda y col., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2004, vol. 34, pp. 578 -
582. El documento WO 02/077258 describe la preparación de ciertos derivados
5 de (S)-1-(2,4- sustituido-fenil)etanol mediante reducción microbiana. Sin
embargo, la reducción microbiana y enzimática estereoselectiva de 1-(2,6-
dicloro-3- fluorofenil)etanona no se ha conocido.

Como alternativa, se puede separar la mezcla de enantiómeros. Sin
embargo, las mezclas de enantiómeros son difíciles, y a menudo imposibles, de
10 separar debido a que las propiedades físicas de los enantiómeros son idénticas
con respecto a las sustancias quirales y solamente se pueden distinguir por su
comportamiento con respecto a otras sustancias quirales. Se han utilizado
procedimientos cromatográficos que usan una fase sólida quiral para separar
las mezclas enantioméricas, pero los soportes sólidos quirales son costosos y,
15 típicamente, la resolución es escasa.

Un procedimiento alternativo de separación de mezclas enantioméricas
es haciéndolas reaccionar con un reactivo quiral. En este procedimiento, la
mezcla de enantiómeros reacciona con el reactivo quiral para formar
diastereómeros que son distinguibles entre sí basándose en sus propiedades
20 respecto a sustancias quirales, y por lo tanto, se pueden separar mediante
técnicas tales como recristalización y cromatografía. Este procedimiento
requiere tiempo largo y da como resultado pérdida de rendimiento debido a que
requiere dos etapas adicionales de reacción (es decir, una reacción para añadir
el auxiliar quiral a los enantiómeros y la otra reacción para eliminarlo después
25 de que los diastereómeros se hayan separado).

En algunos casos, un reactivo quiral reaccionará mucho más rápido con un enantiómero que con otro el enantiómero en la mezcla enantiomérica. En este caso, el enantiómero que reacciona más rápido se puede eliminar antes de que se forme el otro enantiómero. Este procedimiento también necesita dos
5 etapas adicionales de reacción para añadirle auxiliar quiral y eliminarlo después de la separación.

Los procedimientos descritos anteriormente no se pueden aplicar siempre con éxito a un sistema particular, y cuando se pueden aplicar, son a menudo caros, requieren largo tiempo y dan como resultado pérdida en
10 rendimiento. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos procedimientos para obtener un enantiómero individual a partir de una mezcla enantiomérica.

Se sabe que se puede lograr la resolución quiral de compuestos usando enzimas, tales como esterasas, lipasas, y proteasas o microorganismos. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.703.396 describe la resolución
15 quiral de una mezcla racémica de enantiómeros de nucleósidos basándose en hidrólisis enzimática de ésteres de C5'-nucleósidos. La patente de Estados Unidos Nº 6 638.758 describe la resolución enzimática de ésteres racémicos de lactama usando un biocatalizador, tal como una enzima o un microorganismo. La patente de Estados Unidos Nº 5.928.933 describe una enzima con un valor
20 de exceso enantiomérico de 95% para ésteres alquílicos de N-(alcoxicarbonil)-4-ceto-D,L-prolina como resultado de experimentos extensos para especificidad de reacción de 44 enzimas, incluyendo proteasas, lipasas y esterasas. La preparación de ciertos alcoholes secundarios ópticamente activos mediante combinación de hidrólisis enzimática y transformación química se describe, por
25 ejemplo, en Danda y col., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp.8701 - 8716; Vanttinen

y col., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, vol. 6, pp. 1779 - 1786; y Liu y col., *Chirality*, 2002, vol. 14, pp. 25 - 27.

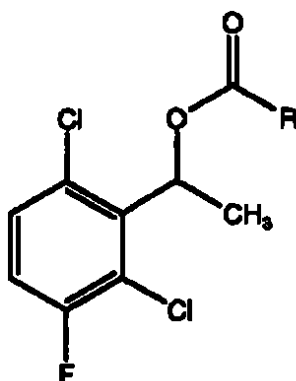
Aunque los biocatalizadores son muy útiles para la separación de mezclas de enantiómeros, debido a la selectividad para enantiómeros y la
5 pureza óptica de productos puede variar dependiendo de la elección de una enzima o microorganismo y de las estructuras químicas de sustratos, se requieren esfuerzos intensivos para encontrar combinaciones de biocatalizadores adecuados para sustratos. Especialmente, en ninguna parte se encuentra un procedimiento para separar ésteres 1-(2,6-dicloro-3-
10 fluorofenil)etanólicos enantioméricos usando un biocatalizador.

Resumen de la invención

Se proporcionan procedimientos para preparar estereoisómeros enantioméricamente puros de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

15 En una realización, la presente invención proporciona (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que está al menos 70% libre de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol; preferiblemente al menos 80% libre de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol; más preferiblemente al menos 90% libre de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol; y lo más preferiblemente al menos 95% libre de
20 (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

En otra realización la presente invención proporciona un procedimiento de separación de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos enantioméricos de fórmula (I):



en la que R es hidrógeno, alquilo C₁ - C₂₀, cicloalquilo C₃ - C₈, arilo C₆ - C₁₄, arilalquilo C₇ - C₁₅, alcoxi C₁ - C₂₀, o alquil C₁ - C₂₀ amino, en la que dichos
5 radicales hidrocarburo pueden estar opcionalmente monosustituídos o polisustituídos con hidroxilo, formilo, oxi, alcoxi C₁ - C₆, carboxi, mercapto, sulfo, amino, alquil C₁ - C₆ amino, nitro o halógeno,

comprendiendo el procedimiento las etapas de:

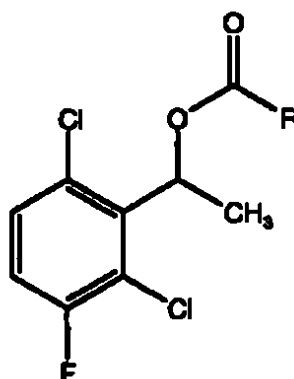
poner en contacto los ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos de
10 fórmula (I) con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos en la que solamente un enantiómero se hidroliza selectivamente para proporcionar un isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y un isómero ópticamente activo sin reaccionar de éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico,
15 y

separar el isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico ópticamente activo sin reaccionar.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona un
20 procedimiento para preparar (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que

comprende las etapas de:

poner en contacto una mezcla de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos de fórmula (i):



- 5 en la que R es hidrógeno, alquilo C₁ - C₂₀, cicloalquilo C₃ - C₈, arilo C₆ - C₁₄, arilalquilo C₇ - C₁₅, alcoxi C₁ - C₂₀, o alquil C₁ - C₂₀ amino, en la que dichos radicales hidrocarburo pueden estar opcionalmente monosustituídos o polisustituídos con hidroxilo, formilo, oxi, alcoxi C₁ - C₆, carboxi, mercapto, sulfo, amino, alquil C₁ - C₆ amino, nitro o halógeno,
- 10 con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos en la que solamente el enantiómero (R)- se hidroliza selectivamente para proporcionar una mezcla de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y un éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico; y
- 15 convertir la mezcla de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico en (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

Otras realizaciones específicas de este procedimiento incluyen aquellas en las que la etapa de conversión comprende:

- 20 a) hacer reaccionar (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol en la

- mezcla de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico con un haluro de sulfonilo orgánico en un disolvente aprótico para formar una mezcla de un éster de ácido sulfónico orgánico de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico;
- 5
- b) adicionalmente hacer reaccionar el éster de ácido sulfónico orgánico de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol en la mezcla del éster de ácido sulfónico orgánico de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico con una sal de metal alcalino de un ácido carboxílico alifático en un disolvente aprótico para formar una mezcla de un éster de ácido carboxílico alifático de (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico; y
- 10
- 15
- c) transformar la mezcla del éster del ácido carboxílico alifático de (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico en (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.
- 20
- Todavía otras realizaciones específicas del procedimiento incluyen aquellas en las que:
- R es metilo;
- el catalizador es esterasa de hígado de cerdo;
- en la etapa de reacción a) el haluro de sulfonilo orgánico es cloruro de
- 25 metanosulfonilo y el disolvente aprótico es piridina;

en la etapa de reacción b) la sal de metal alcalino del ácido carboxílico alifático es acetato de potasio y el disolvente aprótico es dimetilformamida;

la etapa de transformación c) es solvolisis en un disolvente alcohólico o acuoso en presencia de una sustancia básica.

- 5 Todavía otras realizaciones de este procedimiento incluyen las que comprenden la etapa de seleccionar el biocatalizador a través de un procedimiento de selección de alto rendimiento antes de la etapa de puesta en contacto.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que comprende la etapa de reducir 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona mediante un biocatalizador de una manera enantioselectiva para proporcionar el isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

- 15 Otras realizaciones específicas del procedimiento incluyen las que comprenden la etapa de seleccionar el biocatalizador a través de un procedimiento de selección de alto rendimiento antes de la etapa de puesta en contacto.

20 Otras realizaciones específicas del procedimiento incluyen aquellas en las que:

el biocatalizador es la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo o un microorganismo del género *Rhodotorula*.

Definiciones

- 25 El término "biocatalizador", como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a una enzima o un microorganismo.

Las actividades de las enzimas usadas en esta invención se expresan en "unidades". Unidades se definen como la relación de hidrólisis de propionato de p-nitrofenilo expresada en $\mu\text{moles/minuto}$ a temperatura ambiente.

El término "biotransformación", como se usa en esta memoria
5 descriptiva, se refiere a conversión de una sustancia en otros compuestos que emplean una enzima o microorganismo.

El término "biorreducción", como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a un procedimiento en el que se añaden electrones a un átomo o ion (como mediante la adición de hidrógeno o eliminación de oxígeno) que emplea
10 una enzima o microorganismo; dicho procedimiento siempre se produce acompañado de oxidación del agente reductor.

El término "co - factor" o "coenzima" significa una sustancia, que activa una enzima o es necesario para la actividad normal de una enzima. El término "cofactor" o "coenzima" como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a
15 cualquier cofactor o coenzima adecuado que comprende el sistema de reducción enzimática tal como, por ejemplo, NADH, NADPH, FADH, FMNH, y/o PQQ o cualquier cofactor o coenzima adecuado, que se produce con la enzima en el microorganismo.

El término "enzima" incluye aquellas enzimas que se conocen o de otra
20 manera se pueden obtener por los expertos en la técnica relevante y son capaces de lograr las reacciones estereoselectivas descritas en la presente invención.

El término "sistema de reducción enzimática" significa una enzima oxidorreductasa adecuada y la forma reducida de un cofactor para la enzima
25 oxidorreductasa. La enzima que comprende el sistema de reducción enzimática

puede estar o bien en forma libre o inmovilizada, por ejemplo, en una columna o unida a una perla.

El término "resolución enzimática", "proceso enzimático", "procedimiento enzimático" o "reacción enzimática" significa una resolución, proceso, 5 procedimiento o reacción de la presente invención que emplea una enzima o microorganismo.

El término "resolución" significa separación parcial, así como, preferiblemente separación completa de los enantiómeros de una forma racémica.

10 El término "hidrólisis estereoselectiva" se refiere a la hidrólisis preferencial de un enantiómero con relación a otro.

El término "mezcla" como se usa en esta memoria descriptiva en relación a compuestos enantioméricos, significa mezclas que tienen cantidades iguales (racémicas) o desiguales de enantiómeros.

15 El término "exceso enantiomérico (ee)" se refiere al término antiguo de "pureza óptica". En una mezcla de un enantiómero puro (S o R) y un racemato, exceso enantiomérico es el exceso en porcentaje del enantiómero sobre el racemato. Exceso enantiomérico ("ee") se puede expresar en la siguiente ecuación 1, por ejemplo:

20 Ecuación 1

$$ee = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]}$$

[S] = concentración de enantiómero S

[R] = concentración de enantiómero R

El término “valor de enantioselectividad” o “valor E” significa la relación de constantes de especificidad para cada enantiómero del racemato (K_{cat}/K_m) definido más adelante. El valor E se puede interpretar como el número de veces que la enzima es más reactiva respecto a hacia un enantiómero con relación al otro (por ejemplo, un valor E de 50 significa que un enantiómero reacciona aproximadamente 50 veces más rápido que el otro.)

Con el fin de determinar la enantioselectividad del biocatalizador respecto a un enantiómero puro (S o R), se necesita obtener el valor de enantioselectividad (E) (Ecuación 2).

Ecuación 2

$$E = \frac{K_{catS}/K_S}{K_{catR}/K_R} = \frac{\ln [1-c(1+ee_p)]}{\ln [1-c(1-ee_p)]} = \frac{\ln [1-c(1-ee_s)]}{\ln [1-c(1+ee_s)]}$$

K_{catS} = constante de velocidad enzimática de primer orden para el enantiómero S

K_S = constante de Michaelis

c = grado de conversión

ee_p = exceso enantiomérico del producto

ee_s = exceso enantiomérico del sustrato

Por ejemplo, la hidrólisis estereoselectiva de ésteres mediante biocatalizadores, un programa (software Ee2 de la Universidad de Graz) puede calcular el valor E de forma precisa si se conocen el exceso enantiomérico (ee) de o bien el alcohol o el éster en una conversión enzimática particular. El valor ee se puede obtener, por ejemplo, a partir de la ecuación 1. Los datos [S] y [R] se pueden obtener, por ejemplo, mediante HPLC.

El término "HPLC" significa cromatografía líquida de alta presión.

El término "RP-HPLC" significa HPLC de fase inversa.

El término "PLE" significa esterasa de hígado de cerdo.

El término "reducción microbiana" significa la reducción estereoselectiva
5 que se logra mediante el sistema de reducción enzimática, comprendiendo la reductasa microbiana el sistema de reducción enzimática, el microorganismo intacto, o cualquier preparación de los mismos, o similares.

El término "microorganismo" incluye cualquier microorganismo intacto o preparación del mismo, que incluye, por ejemplo, una preparación de células
10 rotas del microorganismo; una preparación deshidratada del microorganismo, por ejemplo, una preparación enzimática en polvo en acetona; un lavado de microorganismos libre de, por ejemplo, medio de fermentación, caldo de cultivo, y similares; microorganismo inmovilizado, por ejemplo, en una columna, unido a perlas, y similares.

15 Como se usa en esta memoria descriptiva, los términos "ópticamente puro", "enantioméricamente puro", "enantiómero puro", y "enantiómero ópticamente puro" significa una composición que comprende un enantiómero de un compuesto y está sustancialmente libre del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto ópticamente puro típico comprende más de
20 aproximadamente 80% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 20% en peso del enantiómero opuesto del compuesto, más preferiblemente mayor que aproximadamente 90% en peso de un enantiómero del compuesto y menos que aproximadamente 10% en peso del enantiómero opuesto del compuesto, incluso más preferiblemente mayor que
25 aproximadamente 95% en peso de un enantiómero del compuesto y menos

que aproximadamente 5% en peso del enantiómero opuesto del compuesto, y lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 97% en peso de un enantiómero del compuesto y menor que aproximadamente 3% en peso del enantiómero opuesto del compuesto.

- 5 El término "mutantes adecuados" incluyen aquellos microorganismos que se conocen o de otra manera se pueden obtener por los expertos en la técnica relevante y son capaces, a pesar de tal mutación, llevar a cabo las reacciones estereoselectivas descritas en la presente invención.

El término "halo" o "halógeno", como se usa en esta memoria
10 descriptiva, salvo que se indique de otra manera, significa fluoro, cloro, bromo o yodo. Los grupos halo preferidos son fluoro, cloro y bromo.

El término "alquilo", como se usa en esta memoria descriptiva, salvo que se indique otra cosa incluye radicales hidrocarburo monovalentes saturados que tienen restos lineales o ramificados.

- 15 El término "alcoxi", como se usa en esta memoria descriptiva, salvo que se indique otra cosa incluye grupos O-alquilo en los que alquilo es como se ha definido anteriormente.

El término "Me" significa metilo, "Et" significa etilo, y "Ac" significa acetilo.

- El término "cicloalquilo", como se usa en esta memoria descriptiva,
20 salvo que se indique otra cosa se refiere a un hidrocarburo no aromático, saturado o parcialmente saturado, monocíclico o condensado, espiro o bicíclico o tricíclico no condensado mencionado en esta memoria descriptiva que contiene un total de entre 3 y 10 átomos de carbono, preferiblemente 5 - 8 átomos de carbono de anillo. Los cicloalquilos ejemplares incluyen anillos
25 monocíclicos que tienen entre 3 y 7, preferiblemente entre 3 y 6 átomos de

carbono, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares.

El término "arilo", como se usa en esta memoria descriptiva, salvo que se indique otra cosa, incluye un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático mediante la eliminación de un hidrógeno, tal como fenilo o naftilo.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a procedimientos biocatalíticos para preparar estereoisómeros enantioméricamente puros de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol. Se describen procedimientos de preparación del enantiómero (S) deseado, dichos procedimientos se basan en una combinación de resolución enzimática, esterificación química, e hidrólisis química con inversión de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílicos o biorreducción estereoselectiva de 2,6-dicloro-3-fluoroacetofenona con un biocatalizador tal como una enzima o un microorganismo.

I. Procedimientos de selección de biocatalizadores automática

Según la presente invención, un procedimiento de selección de alto rendimiento (HTS) práctico y eficaz se usa para identificar los biocatalizadores deseados a partir de cientos de biocatalizadores potenciales tales como enzimas o microorganismos así como numerosos parámetros de reacción potenciales bajo los que pueden funcionar óptimamente. El hecho de que tales parámetros, incluyendo disolvente, contenido en disolvente, pH, temperatura, tiempo, y co - sustratos, estén muchas veces correlacionados de manera no lineal hace la tarea de selección incluso más desafiante.

Un protocolo general de HTS que se ha validado mediante un número de

proyectos globales en Pfizer se describe en Yazbeck y col., *Adv. Synth. Catal.*, 2003, vol. 345, pp. 524 - 532. Usando este planteamiento, cientos de reacciones se pueden establecer y analizar en días, que de otra manera podría requerir semanas usando preparación de reacciones de viales simples. Una gran ventaja ganada mediante el uso de este protocolo es que requiere cantidades muy pequeñas tanto de los catalizadores, por ejemplo, enzimas, que pueden ser muy caros, como de los sustratos racémicos que se seleccionan, que son comúnmente intermedios farmacéuticos disponibles en cantidades limitadas. La base fundamental detrás de este protocolo de HTS es que las enzimas se pueden estabilizar y almacenar durante meses en placas de 96 pocillos adecuadas en ciertas condiciones preparativas. Un segundo requerimiento esencial es que esté disponible un número de instrumentos analíticos diferentes para analizar una diversidad de sustratos seleccionados mediante estas placas de 96 pocillos. Algunas de las herramientas analíticas disponibles incluye cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (EC), cromatografía de gas (CG), espectrometría UV, y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL - EM). La elección de herramienta analítica para usar depende de la naturaleza del sustrato, principalmente sus propiedades de absorbancia y volatilidad. La reactividad de la enzima respecto a los sustratos usualmente se analiza primero, seguida del análisis de los impactos reactivos que usan procedimientos quirales. Se puede usar la misma placa de 96 pocillos muestreada para analizar tanto reactividad como enantioselectividad. La combinación de este protocolo de selección con algoritmos de optimización estadística puede permitir rápidamente y eficazmente al usuario predecir

condiciones importantes y sugerir dónde debería darse una optimización adicional.

II. Preparación de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol ópticamente activo mediante combinación de resolución enzimática y transformación química

5 Se proporciona un procedimiento para la resolución de mezclas de enantiómeros 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

En una realización, el procedimiento implica el uso de un biocatalizador tal como una enzima o microorganismo que preferiblemente cataliza una reacción de un enantiómero en una mezcla. En la realización preferida, el
10 procedimiento implica una resolución enzimática, que se basa en hidrólisis estereoselectiva de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilicos.

En otra realización, el enantiómero que reacciona se puede separar del enantiómero que no ha reaccionado basándose en la nueva diferencia de estructura física.

15 Todavía en otra realización, el enantiómero que ha reaccionado se puede convertir en otro enantiómero mediante transformación química con inversión.

Todavía en otra realización, la conversión del enantiómero que ha reaccionado en otro enantiómero se puede realizar en la mezcla del
20 enantiómero que ha reaccionado y el enantiómero que no ha reaccionado.

II (a) Resolución enzimática basada en la hidrólisis estereoselectiva de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilicos

Se proporciona un procedimiento de hidrólisis estereoselectiva para la
25 resolución enzimática de mezclas de enantiómeros de 1-(2,6-dicloro-3-

fluorofenil)etanol. Dada la descripción en esta memoria descriptiva, los expertos en la técnica son capaces de elegir, usando el procedimiento de selección de alto rendimiento (HTS) descrito anteriormente, una enzima o microorganismo que es selectivo para el enantiómero del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico de elección o selectivo para el enantiómero no deseado, como un procedimiento de eliminarlo, seleccionando una de las enzimas o microorganismos descritos más adelante o mediante evaluación sistémica de las otras enzimas o microorganismos conocidos. Dada esta descripción, los expertos en la técnica también saben cómo modificar el sustrato según sea necesario para lograr la resolución deseada. A través del uso de reactivos de desplazamiento de RMN quiral, polarimetría, o HPLC quiral, se puede determinar el enriquecimiento óptico del éster o alcohol recuperado. Véase, por ejemplo, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, v. 95, p. 512; Trost y col., *J. Org. Chem.* 1986, v. 51, pp. 2370 - 2374; *J. Org. Chem.* 1998, v. 63, p. 8957; *Tetrahedron: Asymmetry* 1995, v. 6, p. 2385; *Tetrahedron: Asymmetry* 1996, v. 7, p. 3285.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente el uso de enzimas o microorganismos para resolver mezclas racémicas de enantiómeros. Se pueden usar otros procedimientos conocidos de resolución de mezclas racémicas en combinación con el procedimiento de resolución descrito en esta memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Roger A Sheldon, *Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds*, Nueva York, Marcel Dekker, 1993. Todas estas modificaciones se consideran dentro del alcance de la invención.

En esta realización, el procedimiento incluye hacer reaccionar el grupo hidroxilo de una mezcla de enantiómeros de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol

con un compuesto acilo para formar ésteres en los que 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol está en el extremo "carbinol" del éster. La mezcla de enantiómeros del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico después se trata con un biocatalizador que escinde preferiblemente, o hidroliza, uno de los
5 enantiómeros y no el otro.

Una ventaja de este procedimiento es que se puede usar para resolver una amplia diversidad de 1-(fenil)etanoles que están opcionalmente sustituidos en el resto carbinol. La amplia aplicabilidad de este procedimiento puede residir en parte en el hecho de que aunque la porción carbinol del éster puede jugar
10 un papel en la capacidad de un biocatalizador de diferenciar enantiómeros, el sitio de reconocimiento principal para estos biocatalizadores puede estar en la parte de ácido carboxílico del éster. Además, uno puede ser capaz de extrapolar con éxito los resultados de un estudio de biocatalizador/sustrato a otro, sistema aparentemente diferente, con tal que las porciones de ácido
15 carboxílico de los dos sustratos sean iguales o sustancialmente similares.

Todavía otra ventaja de este procedimiento es que la separación del enantiómero no hidrolizado y el enantiómero hidrolizado de la mezcla de reacción puede ser bastante simple. El enantiómero no hidrolizado puede ser más lipófilo que el enantiómero hidrolizado y se puede recuperar eficazmente
20 mediante extracción simple con uno de una amplia diversidad de disolventes orgánicos no polares o mezclas de disolventes, por ejemplo, hexano y hexano/éter. El enantiómero menos lipófilo, más polar, hidrolizado se puede después obtener mediante extracción con un disolvente orgánico más polar, por ejemplo, acetato de etilo, o mediante liofilización, seguido de extracción,
25 por ejemplo, con etanol o metanol.

La enzima o microorganismos se pueden usar solos o en combinación. Dependiendo del tipo de enzima o microorganismo usado, uno cualquiera de los isómeros ópticos del éster se hidroliza predominantemente para proporcionar el alcohol ópticamente activo. Se puede obtener uno cualquiera de los isómeros ópticos mediante la selección de una enzima o microorganismo adecuado.

Con el acoplamiento apropiado de enzima y sustrato, se pueden establecer condiciones para el aislamiento de cualquier enantiómero de 1-(2,6-3-fluorofenil)etanol. El enantiómero deseado se puede aislar mediante tratamiento de la mezcla racémica con una enzima que hidroliza el enantiómero deseado (seguido de extracción del hidrolizado polar con un disolvente polar) o mediante tratamiento con una enzima que hidroliza el enantiómero no deseado (seguido de la eliminación del enantiómero no deseado con un disolvente no polar).

15 II (b) Biocatalizadores

En una realización de la presente invención, el procedimiento de resolución enzimática emplea una enzima como biocatalizador para hidrólisis estereoselectiva de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilicos. Los ejemplos de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres incluyen, pero no se limitan a, 20 esterasas, lipasas y proteasas (subtilisina y α -quimotripsina). La enzima puede ser cualquier enzima obtenible de animales, plantas, microorganismos, etc. La enzima se puede emplear de cualquier forma convencional tal como en una forma purificada, una forma bruta, una mezcla con otras enzimas, un caldo de fermentación microbiana, un caldo de fermentación, un cuerpo microbiano, un 25 filtrado de caldo de fermentación, y similares, bien solos o en combinación.

Además, la enzima o cuerpo microbiano se puede inmovilizar sobre una resina.

Los ejemplos específicos de la enzima son los obtenidos a partir de animales y plantas útiles en la presente invención incluyendo, pero sin limitación, esterasa de hígado de vaca, esterasa de hígado de cerdo, esterasa de páncreas de cerdo, esterasa de hígado de caballo, esterasa de hígado de perro, fosfatasa de cerdo, amilasa obtenible de cebada y patata y lipasa obtenible de trigo. Por ejemplo, las aplicaciones de esterasa de hígado de cerdo en síntesis asimétrica se describen en *Tetrahedron*, 1990, vol. 46, pp. 6587 - 6611; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, edición 2ª, Wiley - VCH 2002, vol. II, pp. 384 - 397. Otros ejemplos son hidrolasas obtenidas a partir de microorganismos tales como *Rhodotorula*, *Trichoderma*, *Candida*, *Hansenula*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Alkaligenes*, *Pediococcus*, *Klebsiella*, *Geotrichum*, *Lactobacillus*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Actinomucor*, *Enterobacter*, *Torulopsis*, *Corynebacterium*, *Endomyces*, *Saccaromyces*, *Arthrobacter*, *Metshnikowia*, *Pleurotus*, *Streptomyces*, *Proteus*, *Gliocladium*, *Acetobacter*, *Helminthosporium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Absidia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Penicillium* y *Schizophyllum* así como a partir de liquen y algas.

Las enzimas ejemplares, comercialmente disponibles adecuadas para uso en la presente invención incluyen esterases tales como, por ejemplo, esterasa de hígado de cerdo (Biocatalytics Inc.), lipasas tales como Amano PS - 30 (*Pseudomonas cepacia*), Amano GC - 20 (*Geotrichum candidum*), Amano APF (*Aspergillus niger*), Amano AK (*Pseudomonas sp.*), lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Biocatalyst Ltd.), Amano Lipasa P30

(*Pseudomonas sp.*), Amano P (*Pseudomonas fluorescens*), Amano AY - 30 (*Candida cylindracea*), Amano N (*Rhizopus niveus*), Amano R (*Penicillium sp.*), Amano FAP (*Rhizopus oryzae*), Amano AP - 12 (*Aspergillus niger*), Amano MAP (*Mucor melhei*), Amano GC - 4 (*Geotrichum candidum*), Sigma L - 0382 y
 5 L - 3126 (pancreasa porcina), Lipasa OF (Sepracor), Esterasa 30.000 (Gist - Brocarde), KID Lipasa (Gist - Brocarde), Lipasa R (*Rhizopus sp.*, Amano), Sigma L - 3001 (germen de trigo), Sigma L - 1754 (*Candida cylindracea*), Sigma L - 0763 (*Chromobacterium viscosum*) y Amano K - 30 (*Aspergillus niger*). Adicionalmente, enzimas ejemplares derivadas de tejido animal incluyen
 10 quimotripsina y pancreatina de páncreas tales como lipasa pancreática porcina (Sigma). Dos o más, así como una única enzima se puede emplear cuando se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención.

Además, se pueden usar enzimas, que son serina carboxipeptidasas. Estas enzimas se derivan de *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*,
 15 trigo (*Triticum aestivum*) y *Penicillium janthinellum*. También se pueden usar cristales de enzimas reticulados comercialmente disponibles tales como de Altus Biologics, Inc. (por ejemplo, ChiroCLEC-CR, ChiroCLEC-PC, ChiroCLEC-EC).

La presente invención también se refiere al uso de esterasas
 20 termoestables y esterasas modificadas por ingeniería genética para la resolución de los ésteres. Estas enzimas, comercialmente disponibles de ThermoGen, Inc., son especialmente adecuadas para uso en procedimientos industriales y son fáciles de usar. Además de funcionar en un amplio intervalo de temperaturas que incluyen altas temperaturas, estas enzimas termoestables
 25 poseen un incremento de vida útil que mejora la manipulación. Las enzimas

son también capaces de resistir condiciones severas, no biológicas (pH, concentraciones salinas, etc.) usualmente asociadas a procedimientos industriales debido a su estabilidad en condiciones operativas. Se pueden inmovilizar para reutilizar en múltiples aplicaciones, mejorando la rentabilidad del procedimiento.

Durante el aislamiento de los productos después de resolución enzimática, las enzimas se exponen frecuentemente a cantidades pequeñas de disolventes orgánicos. Además, algunas resoluciones enzimáticas se encuentran que trabajan mejor en una mezcla de disolventes acuosos y orgánicos o en disolventes orgánicos solos. Las enzimas esterasas de la presente invención son más tolerantes a la desnaturalización mediante muchos disolventes orgánicos comparadas con enzimas convencionales que permiten semividas operacionales más duraderas. La mayoría de las enzimas esterasas se producen usando técnicas de ingeniería genética de clonación de genes que asegura la pureza de estas enzimas y la facilidad de controles del procedimiento durante el crecimiento en escala. En lugar de enzimas aisladas, se puede emplear también un microorganismo que puede producir cualquier enzima descrita anteriormente.

En otra realización de la presente invención, el procedimiento de resolución enzimática emplea un microorganismo como biocatalizador para hidrólisis estereoselectiva de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilicos. Los ejemplos específicos de los microorganismos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*, *Candida krusei*, *Candida cylindracea*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Rhizopus chinensis*, *Mucor pusillus*, *Aspergillus niger*, *Alkaligenes faecalis*, *Torulopsis ernobii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pulmilus*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Pediococcus acidlactici*, *Klebsiella pneumoniae*, *Absidia*
5 *hyalospora*, *Geotrichum candidum*, *Schizophyllum commune*, *Nocardia uniformis subtsuyanareus*, *Nocardia uniformis*, *Chromobacterium chocolateum*, *Hansenula anomala* var. *ciferrii*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Achromobacter lyticus*, *Achromobacter parvulus*, *Achromobacter simplex*, *Torulopsis candida*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Endomyces geotrichum*,
10 *Saccaromyces carrvisial*, *Arthrobacter globiformis*, *Streptomyces grisens*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Corynebacterium ezui*, *Lactobacillus casei*, *Cryptococcus albidus*, *Pichia polimorpha*, *Penicillium frezuentans*, *Aureobasidium pullulans*, *Actinomucor elegans*, *Streptomyces grisens*, *Proteus vulgaris*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Acetobacter aurantius*,
15 *Helminthosporium* sp., *Chromobacterium iodinum*, *Chromobacterium violaceum*, *Flavobacterium lutescens*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pleurotus ostreatus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Escherichia coli*, *Rodotorula minuta* var. *texensis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Mucor javanicus*, *Flavobacterium arbonescens*, *Flavobacterium heparinum*, y
20 *Flavobacterium capsulatum*.

Las enzimas y/o microorganismos usados en la presente invención pueden estar en forma bruta o en forma inmovilizada. Se pueden inmovilizar sobre diversos soportes sólidos sin pérdida de estereoespecificidad o cambio en estereoselectividad. Los soportes sólidos pueden ser absorbentes inertes a
25 los que la enzima no está covalentemente unida. En cambio la enzima se

absorbe tal como mediante interacciones de porciones hidrófobas o hidrófilas de una proteína con las regiones parecidas del absorbente inerte, mediante enlace de hidrógeno, mediante formación de puentes de sal, o mediante interacciones electrostáticas. Los materiales absorbentes inertes incluyen, pero
5 no se limitan a, polímeros sintéticos (por ejemplo, poliestireno, poli(alcohol vinílico), polietileno y poliamidas), compuestos minerales (por ejemplo, tierra de diatomeas y tierra de Fuller), o polímeros de origen natural (por ejemplo, celulosa). Los ejemplos específicos de tales materiales incluyen tierra de diatomeas Celita 545, perlas de resina polimérica Abelite XAD -8 y
10 polietilenglicol 8000.

La enzima se puede inmovilizar también sobre el soporte al que la enzima está unida covalentemente (por ejemplo, perlas de oxirano - acrílicas y soportes activados por glutaraldehído). Los ejemplos específicos incluyen perlas de oxirano acrílicas Eupergit C y Celita 545 activada por glutaraldehído.
15 Otros posibles sistemas inmovilizantes se conocen bien y están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica de inmovilización de enzimas.

En lugar de procedimientos de inmovilización convencionales descritos anteriormente, las enzimas también se pueden reciclar convenientemente para reutilización simplemente separando por precipitación las enzimas usadas con
20 sulfato de amonio. El conjunto sulfato de amonio - enzima precipitada se puede usar directamente en la siguiente hidrólisis enzimática. Las sales se usan comúnmente en la purificación de enzimas. Generalmente protegen las enzimas proteicas reduciendo la actividad del disolvente. Por ejemplo, se pueden usar sulfato de amonio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, cloruro
25 de sodio, etc., en la recuperación de la actividad enzimática.

La enzima o microorganismos se pueden usar solos o en combinación. Dependiendo del tipo de enzima o microorganismo usado, uno cualquiera de los isómeros ópticos del éster se hidroliza predominantemente para proporcionar el alcohol ópticamente activo. Se puede obtener uno cualquiera de los isómeros ópticos mediante la selección de una enzima o microorganismo adecuado.

II (c) Sustratos

El grupo acilo más eficaz a usar para esterificar 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol se puede determinar sin excesiva experimentación mediante evaluación de un número de homólogos usando el sistema enzimático seleccionado. Los ejemplos no limitantes de grupos acilo que se pueden evaluar para uso con una enzima o microorganismo particular incluyen ácidos alquilcarboxílicos y ácidos alquilcarboxílicos sustituidos, incluyendo ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, y ácido pentanoico. Con ciertas enzimas o microorganismos, se puede preferir usar un compuesto acilo que es significativamente atractor de electrones para facilitar la hidrólisis mediante debilitación de enlace éster. Los ejemplos de grupos acilo atractores de electrones incluyen α -haloésteres tales como ácido 2- cloropropiónico, ácido 2- clorobutírico, y ácido 2-cloropentanoico. Los α - haloésteres son excelentes sustratos para lipasas. Además, el uso de anhídrido succínico como agente acilante para resolución práctica de alcoholes aril - alquílicos mediante acilación catalizada por lipasa se ha reseñado en Bouzemi y col., *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, pp. 627 - 630.

Los diferentes procedimientos de esterificación conocidos en la técnica se pueden usar para preparar los sustratos de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-

fluorofenil)etílicos. Véase por ejemplo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, vol. 18, p. 1391; *J. Org. Chem.* 1994, vol. 59, 6018.

II (d). Condiciones de reacción para hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la presente invención se puede llevar a cabo
5 poniendo en contacto los ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílicos con la enzima o microorganismo, usualmente en un medio de tampón acuoso con buena agitación.

El medio de tampón puede ser tampones de sales de ácidos inorgánicos (por ejemplo, fosfato diácido de potasio, fosfato diácido de sodio), tampones de
10 sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, citrato de sodio), o cualquier otro tampón adecuado. La concentración del tampón puede variar entre 0,005 y 2 M, preferiblemente entre 0,005 y 0,5 M y dependerá del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico específico y la enzima o microorganismo usado.

Las hidrólisis enzimáticas realizadas en condiciones heterogéneas
15 pueden sufrir escasa reproducibilidad. Por lo tanto, se prefiere que la hidrólisis se realice en condiciones homogéneas. Dependiendo de la solubilidad de los ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílicos, homogeneidad se puede lograr mediante el uso de tensioactivos. Los tensioactivos preferidos incluyen pero no se limitan a tensioactivos no iónicos tales como alcoholes alquilarilpoliéter. Un
20 tensioactivo preferido es octilfenoxipolietoxietanol, comercialmente disponible como Tritón X - 100 (Sigma Chemical Company). Se usa una cantidad eficaz de tensioactivo. Las cantidades típicas pueden variar entre 0,05% y aproximadamente 10% (v/v).

Sin embargo, estos tensioactivos no solamente ayudan en la disolución
25 de los materiales de partida, también potencian la solubilidad acuosa del

producto. Por lo tanto, aunque la reacción enzimática puede proceder más eficazmente con la adición de un tensioactivo no iónico que en condiciones heterogéneas, el aislamiento de ambos el material de partida recuperado y el producto se puede hacer más difícil. El producto se puede aislar con técnicas
5 cromatográficas y químicas apropiadas (por ejemplo, formación de sal selectiva).

Algunas veces es preferible añadir una cantidad eficaz de un co - disolvente orgánico para incrementar la solubilidad del producto para facilitar la reacción. Los ejemplos de co - disolventes incluyen pero no se limitan a
10 acetonitrilo, THF, DMSO, DMF, alcoholes, etc. Las cantidades eficaces de un co - disolvente incluyen entre 1% y 30% (v/v) dependiendo del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico específico y la enzima o microorganismo usado.

Las hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo típicamente con una cantidad catalítica de la enzima es un tampón acuoso que tiene un pH que está cerca
15 del pH óptimo para la enzima en cuestión. A medida que la reacción sigue adelante, el pH cae como resultado de ácido carboxílico liberado. Se puede añadir base acuosa para mantener el pH cerca del valor óptimo para la enzima. El progreso de la reacción se puede determinar fácilmente controlando el cambio en pH y la cantidad de base necesaria para mantener el pH.

20 El pH de los tampones o el pH de la reacción están normalmente entre 4 y 10, preferiblemente entre 5 y 9, más preferiblemente entre 7 y 8. La temperatura de reacción puede variar entre 0 y 100°C, y dependerá del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico específico y de la enzima o microorganismo usado. El tiempo de reacción está generalmente entre 1 hora y 70 horas y
25 dependerá del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico específico, concentración

de enzima y la enzima o microorganismo usado. Normalmente, la hidrólisis enzimática se deja que proceda durante un período suficiente para generar una cantidad satisfactoria del éster deseado o 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol deseado con pureza óptica satisfactoria. A medida que la reacción progresa, la
5 cantidad de éster o alcohol deseado y su pureza óptica se puede controlar mediante HPLC y HPLC quiral. Normalmente, la conversión se lleva a cabo aproximadamente al 50%, después de lo cual el alcohol y los ésteres se pueden obtener con buenos rendimientos después de aislamiento.

La cantidad de enzima usada puede variar ampliamente entre 5
10 unidades y 12.000 unidades de enzima por mol de material de partida. La cantidad de enzima necesaria dependerá de la temperatura, el éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico específico, las enzimas y/o microorganismo usados, y el tiempo de reacción deseable. También puede ser deseable usar una gran cantidad de enzimas en algunos casos para asegurar un tiempo de reacción
15 prácticamente corto, especialmente cuando las enzimas están inmovilizadas y se pueden reutilizar durante muchos recambios. La concentración del sustrato de éster puede estar entre 0,1 g/l y 500 g/l y depende del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico específico y la enzima y/o microorganismo usado.

II (e) Aislamiento de producto

20 Los productos deseados, el éster sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) y el alcohol ópticamente puro o enriquecido se pueden aislar a partir de la mezcla de hidrólisis usando procedimientos convencionales tales como extracciones, extracciones ácido - base, filtración, cromatografía, cristalización o las combinaciones de los mismos. Andreas Liese, y col.,
25 *Industrial Biotransformations*, Weinheim: WILEY - VCH, 2000. La enzima o

microorganismo recuperado se puede reciclar como se ha descrito anteriormente.

II (f) Conversión enantiomérica basada en esterificación e hidrólisis química con inversión

5 Según la presente invención, cualquier enantiómero de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol se puede convertir en el otro enantiómero de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol si se desea. Esta conversión se puede realizar, por ejemplo, mediante una reacción de sustitución nucleófila en C - 1 acompañada de una inversión estérica. Tal reacción se llevar a cabo con el uso de un reactivo
10 nucleófilo.

Los procedimientos para la conversión de alcohol ópticamente activo en el correspondiente enantiómero incluyen, pero no se limitan a, los siguientes procedimientos.

Por ejemplo, un procedimiento comprende la conversión del grupo
15 hidroxilo en el átomo de carbono asimétrico del enantiómero particular en un éster de ácido sulfónico orgánico, preferiblemente un éster de ácido metanosulfónico o un éster de ácido p-tolueno sulfónico, que se convierte directamente en el otro enantiómero mediante sustitución nucleofílica e inversión de la configuración mediante uno de sus éteres de ácido carboxílico y
20 su posterior solvolisis o hidrólisis. Los ésteres de ácido sulfónico se preparan mediante procedimientos conocidos mediante reacción de cualquier enantiómero de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol con haluros de sulfonilo orgánicos, preferiblemente cloruro de metanosulfonilo y cloruro de p-toluenosulfonilo, en disolventes apróticos, preferiblemente piridina y
25 diclorometano, si es apropiado en presencia de una base, tal como trietilamina.

Un procedimiento que comprende la esterificación de un alcohol ópticamente activo con HNO_3 fumante o cloruro de mesilo para nitrar o mesilar, e hidrolizar el nitrato o mesilato resultante con inversión estérica en condiciones neutras (en presencia de 0,7 a 2,0 equivalentes de CaCO_3 o NaOAc), básicas
5 (K_2CO_3) o ácidas (H_2SO_4 acuoso al 2,5% o HNO_3 acuoso al 2,5%) se describe, por ejemplo, en Danda y col., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701 - 8716; y Wang y col., *J. Med. Chem.*, 2000, vol. 43, Nº 13, pp. 2566 - 2574.

Se describe un procedimiento que comprende la conversión de un alcohol ópticamente activo en un éster de ácido sulfónico tal como éster del
10 ácido p-toluenosulfónico, permitiendo que una sal de ácido orgánico tal como acetato de tetraetilamonio y acetato de sodio (y ácido acético) reaccione con el éster de ácido sulfónico resultante para invertir estéricamente para dar el éster de ácido orgánico correspondiente, e hidrolizar el éster de ácido orgánico resultante, por ejemplo, en *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, v. 87, p. 3682; y *J. Chem.*
15 *Soc.*, 1954, p. 965.

Se describe un procedimiento que comprende la esterificación de un alcohol ópticamente activo en un éster de ácido carboxílico tal como éster de ácido tricloroacético, e hidrolizar el éster de ácido carboxílico resultante, en un disolvente de agua - éter tal como H_2O al 75% - dioxano, por ejemplo, en
20 *Chem. Lett.*, 1976, p. 893.

Otro ejemplo es la reacción de Mitsunobu, dicha reacción comprende hacer reaccionar un alcohol ópticamente activo con un ácido orgánico en presencia de triarilfosfina (por ejemplo, trifenilfosfina) y un éster de ácido azodicarboxílico tal como azodicarboxilato de dietilo para formar el éster de
25 ácido orgánico correspondiente estéricamente invertido, e hidrolizar el éster

resultante. El ácido orgánico incluye, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido benzoico y similares. La formación del éster de ácido orgánico se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente -60°C a 60°C. La reacción se puede

5 llevar a cabo en un disolvente inerte tal como un hidrocarburo aromático (por ejemplo, benceno, tolueno, etc.) y un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano, etc.) Las proporciones de trialquilfosfina, ácido orgánico y éster de ácido azodicarboxílico basado en 1 mol de alcohol ópticamente activo están respectivamente entre 0,7 y 2,0 moles. La hidrólisis del éster de ácido orgánico

10 se puede llevar a cabo mediante una manera convencional tal como hidrólisis ácida o básica. Véase, por ejemplo, *Synntesis*, 1981, p. 1; Danda y col., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701 - 8716; Vanttinen y col., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, vol. 6, pp. 1779 - 1786; y Liu y col., *Chirality*, 2002, vol. 14, pp. 25 - 27.

15 II (g). Combinación de hidrólisis enzimática, esterificación e hidrólisis química con inversión

Una limitación principal del procedimiento de resolución enzimática es que el rendimiento máximo es del 50% basado en el racemato. Como procedimiento para superar esta limitación, se puede usar combinación de

20 hidrólisis enzimática, esterificación e hidrólisis química con inversión. Véase, por ejemplo, Danda y col., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701 - 8716; Vanttinen y col., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, vol. 6, pp. 1779 - 1786; y Liu y col., *Chirality*, 2002, vol. 14, pp. 25 - 27.

Según la presente invención, una mezcla bruta del éster sin reaccionar

25 ópticamente puro (o enriquecido) y el alcohol ópticamente puro (o enriquecido)

obtenido mediante hidrólisis enzimática, se pueden someter a conversión enantiomérica basándose en esterificación e hidrólisis química con inversión en un recipiente según los procedimientos descritos anteriormente.

Dependiendo del sustrato del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico, se puede emplear una enzima o microorganismo apropiado para hidrólisis enzimática y se pueden elegir condiciones apropiadas para hidrólisis química. Por ejemplo, una mezcla bruta del éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico sin reaccionar y el (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que ha reaccionado sin separación se puede esterificar con cloruro de mesilo como se describe en Danda y col., *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, pp. 8701 - 8716; y Wang y col., *J. Med. Chem.*, vol. 43, pp. 2566 - 2574. De manera sucesiva, una mezcla bruta resultante del mesilato de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo correspondiente y éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico sin purificación se puede hidrolizar para producir, (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol, con inversión de mesilato de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo y retención del éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico. En una realización específica, el sustrato del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etílico es acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo. En una realización específica, la enzima es esterasa de hígado de cerdo.

Los procedimientos para conversión de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol en (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol también se pueden aplicar a la conversión del enantiómero (S) en el enantiómero (R).

II (h). Racemización y aplicación a resolución cinética dinámica

Cualquier éster sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) y el alcohol ópticamente puro (o enriquecido) se puede racemizar si se desea. El

éster sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) se puede racemizar calentando en la base apropiada en las condiciones apropiadas. Como alternativa, el éster sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) se puede racemizar mediante calentamiento en ácido en la presencia de un alcohol en condiciones apropiadas. El alcohol sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) también se puede racemizar y convertir en los ésteres racémicos mediante calentamiento en ácido en condiciones apropiadas. De esta manera, se pueden lograr rendimientos excelentes de cualquier éster sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) o alcohol ópticamente puro (o enriquecido) mediante esta combinación de técnicas de hidrólisis y racemización enzimática estereoselectiva.

Por ejemplo, se puede usar un procedimiento de resolución cinética dinámica (o transformaciones asimétricas de segundo orden) para alcoholes secundarios, en el que los alcoholes se racemizan de manera continua con catalizadores metálicos, tales como sistemas catalíticos basados en rutenio, durante una resolución enzimática. Dijksman y col., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, vol. 13, pp. 879 - 884; Kim y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, pp. 11494 - 11495; Choi y col., *J. Org. Chem.*, 2004, vol. 69, 1972 - 1977.

II (i). Acilación catalizada por enzimas

Las reacciones enzimáticas han probado que son un procedimiento conveniente para obtener compuestos ópticamente enriquecidos a partir de su forma racémica mediante resolución cinética. C.-H Wong y G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford (1994); K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin (1995); Gotor, Vicente. "Enzymes In Organic Solvents: The Use Of Lipases And (R)-

Oxynitrilase For The Preparation Of Products Of Biological Interest". *Molecules* [Publicación electrónica] 2000, vol. 5, pp. 290 - 292.

Por ejemplo, los alcoholes se pueden resolver a través de transesterificación catalizada por lipasas (acilación) con ésteres enólicos en una reacción generalmente irreversible. Y. F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter y C.-H. Wong. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, vol. 110, pp. 7200 - 7205. Sin embargo, para que sea de interés preparativo tal procedimiento requiere (i) un factor E de alta enantioselectividad, (ii) fácil separación del sustrato sin reaccionar (alcohol) del producto (éster). Se ha mostrado que el uso de un anhídrido cíclico como agente acilante ofrece una solución conveniente para este requerimiento. Bouzemi y col., *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, pp. 627 - 630. El éster ácido producido se puede separar fácilmente del alcohol sin reaccionar mediante una extracción simple líquido - líquido mediante disolvente orgánico base acuosa. Además, ya que la separación de estos compuestos es fácil incluso para cantidades muy diferentes de producto y sustrato sin reaccionar, alcoholes de alta pureza enantiomérica se pueden obtener a partir de un sustrato racémico incluso en los casos de bajos valores de *E*, con tal que la acilación se lleve a cabo hasta alta conversión.

Las reacciones se pueden llevar a cabo usando sustrato racémico disuelto en éter dietílico. Acetatos de vinilo o isopropenilo (2 equivalentes) o anhídrido succínico (1 equivalente), se pueden añadir después, seguido de la enzima. Por ejemplo, lipasas comercialmente disponibles tales como lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) y lipasa B de *Candida antarctica* (CAL B), se pueden utilizar como enzima inmovilizada. La mezcla resultante se puede

agitar a temperatura ambiente durante el tiempo apropiado para que alcance aproximadamente conversión al 50%. Con ésteres enólicos como agentes acilantes, el alcohol sin reaccionar y el acetato producido se separaron mediante cromatografía ultra - rápida sobre gel de sílice. Los ee de ambos
5 compuestos se pueden medir antes de la separación mediante análisis usando HPLC quiral. Con anhídrido succínico como agente acilante, el alcohol sin reaccionar, por ejemplo, alcohol (S), y el monosuccinato (R) producidos se pueden separar mediante extracción líquido - líquido de disolvente orgánico - base acuosa. La fase acuosa se puede hacer alcalina con hidróxido sódico y el
10 alcohol (R) resultante extraerse con un disolvente orgánico. Los excesos enantioméricos de alcohol (S) - enriquecido y el alcohol (R) - enriquecido sin reaccionar producidos se pueden evaluar, por ejemplo, mediante HPLC quiral.

III. Bio - reducción enantioselectiva de 1-(2,6-dicloro-3-
15 fluorofenil)etanona

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que comprende la etapa de reducir 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona mediante un biocatalizador de una manera enantioselectiva en una solución acuosa, un
20 disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos para proporcionar el isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol. Dada la descripción en esta memoria descriptiva, los expertos en la técnica serán capaces de elegir, usando el procedimiento de selección de alto rendimiento (HTS) descrito anteriormente, una enzima o
25 microorganismo que reduzca selectivamente la 1-(2,6-dicloro-3-

fluorofenil)etanona a cualquier enantiómero de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol, mediante la selección de una de las enzimas o microorganismos descritos en esta memoria descriptiva o mediante evaluación sistémica de otras enzimas o microorganismos conocidos. Los expertos en la técnica entenderán basándose en la descripción proporcionada en esta memoria descriptiva cómo seleccionar las condiciones de la reacción de bio-reducción de manera que se logre la estereoselectividad deseada. A través del uso de reactivos de desplazamiento de RMN quiral, polarimetría, o HPLC quiral, se puede determinar el enriquecimiento óptico del alcohol recuperado. Véase por ejemplo, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, v. 95, p. 512; Trost y col., *J. Org. Chem.* 1986, v. 51, pp. 2370 - 2374; *J. Org. Chem.* 1998, v. 63, p. 8957; *Tetrahedron: Asymmetry* 1995, v. 6, p. 2385; *Tetrahedron: Asymmetry* 1996, v. 7, p. 3285.

El enantiómero deseado, por ejemplo, (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol, después se aísla opcionalmente a partir de cualquier sustrato residual y otros componentes de reacción usando procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, las mezclas de reacción se pueden extraer con un disolvente adecuado tal como MeOH y analizarse mediante RP-HPLC; el alcohol correspondiente se puede separar a partir de los otros compuestos orgánicos mediante cromatografía ultra rápida, y el alcohol purificado se puede analizar mediante HPLC quiral, véase, por ejemplo, Allenmark y col., *Enzyme Microbial Technol.*, 1989, vol. 11, pp. 177 - 179), antes de su uso preferido como intermedio en la síntesis de ciertos análogos de 2-aminopiridina unidos a éter, enantioméricamente enriquecidos que inhiben potentemente la autofosforilación de receptor del factor de crecimiento de

hepatocitos humanos, como se describe en el ejemplo 3 en esta memoria descriptiva.

En general, solamente una muy pequeña cantidad (por ejemplo entre aproximadamente 1% de ee y aproximadamente 5% de ee), si la hay, del enantiómero no deseado se produce mediante los procedimientos de bio -
5 reducción estereoselectiva de esta invención. Todavía, cuando se desea, la cantidad del enantiómero deseada se puede separar sustancialmente de la cantidad del enantiómero no deseado, por ejemplo, mediante cristalización.

Los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo fácilmente.
10 De este modo, una enzima o microorganismo o bien se incuba (la enzima, preparación de células rotas, preparación deshidratada, o cualquier otra preparación adecuada del microorganismo) o se fermenta (microorganismo intacto) en presencia de una cantidad del sustrato, 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona, para producir una mayor cantidad del enantiómero
15 deseado de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol, que del enantiómero no deseado, por lo tanto, en una etapa, dando como resultado el enantiómero ópticamente enriquecido.

Adecuados en principio para el procedimiento según la invención son todos los microorganismos tales como hongos, levaduras o bacterias o
20 enzimas o sistemas enzimáticos tales como las diversas alcohol y aldehído deshidrogenasas, las lactato o formiato deshidrogenasas, preferiblemente alcohol y aldehído deshidrogenasas, capaces de reducir compuestos carbonílicos o aldehídos a los alcoholes. Los microorganismos se pueden usar directamente después de cultivo (biomasas húmeda) o después de liofilización
25 (materia seca) para el procedimiento según la invención. Los microorganismos

o enzimas usados de manera ventajosa son aquellos capaces de reducir 1-(2,6- dicloro-3-fluorofenil)etanona al enantiómero deseado de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol con una pureza enantiómerica que excede de 85% de ee, preferiblemente excediendo de 90% de ee y muy particularmente excediendo preferiblemente de 95% de ee. Los ejemplos de microorganismos adecuados son organismos del género *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Diplodia*, *Endomycopsis*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Mucor*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pfaffia*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Streptomyces*, *Torulopsis* o *Yarrowia*. Las siguientes especies de los géneros anteriormente mencionados se usan de manera ventajosa: *Alcaligenes eutrophus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Beauveria bassiana*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida membranaefaciens*, *Candida methylica*, *Candida parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Curvularia falcata*, *Diplodia gossypina*, *Cryptococcus macerans*, *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*, *Hansenula beckii*, *Hansenula holstii*, *wingei*, *Hansenula polymorpha*, *Mucor sp.*, *Nocardia rubropertincta*, *Pfaffia rhodozyma*, *Pichia glucozyma*, *Pichia fermentans*, *Pichia capsulata*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula termusruber*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces japonicus*,

Schizosaccharomyces malidevorans, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis enokii*, *Torulopsis methanothermo* y *Yarrowia lipolytica*. Los diversos géneros de levaduras tales como *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pfaffia*, *Pichia*, *Rhodotorula*,
5 *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis* y *Yarrowia* se usan preferiblemente. Particular y preferiblemente usados son los géneros y especies *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida membranifaciens*, *Candida methylica*, *Candida parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Hansenula anomala*, *Hansenula beckii*, *Hansenula holstii*,
10 *wingei*, *Hansenula polymorpha*, *Pfaffia rhodozyma*, *Pichia glucozyma*, *Pichia fermentans*, *Pichia capsulata*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula termusruher*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces kluyveri*,
15 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis enokii*, *Torulopsis methanothermo* y *Yarrowia lipolytica*, muy particular y preferiblemente los géneros y especie. *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces*
20 *cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Pichia fermentans*, *Hansenula polymorpha*, *Rhodotorula gracilis*, *Candida utilis* y *Candida magnoliae*.

Los microorganismos se pueden transformar genéticamente para mejorar la producción de enzima en una célula, para proporcionar enzimas que
25 regeneran coenzimas en la misma célula, para mejorar las

enantioselectividades pobres debido a la presencia de enzimas plurales en una célula con especificidades de sustrato que se solapan pero enantioselectividades diferentes, para solucionar el problema de exceso de metabolismo etc, como se describe, por ejemplo, en Nakamura y col.,
5 *Tetrahedron: Assymetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659 - 2681.

Uno o más de cualquiera de los microorganismos adecuados se pueden usar en los procedimientos de la presente invención. Como se ha descrito anteriormente, el microorganismo usado en los procedimientos sujetos puede estar intacto, cualquier preparación adecuada del mismo, por ejemplo, una
10 preparación de células rotas del mismo, una preparación deshidratada del mismo, y estar o bien libre o inmovilizado. Sin embargo, cuando se emplea un microorganismo no intacto en la presente invención tal como, por ejemplo, una preparación de células rotas, por ejemplo, extracto celular, preparación enzimática en polvo en acetona, o la enzima derivada del mismo, los expertos
15 en la técnica entenderían que también está incluido un co - factor adecuado para la enzima.

Los expertos en la técnica entenderán a partir de la descripción proporcionada en esta memoria descriptiva y su conocimiento relacionado cómo preparar una preparación de células rotas adecuada tal como se
20 describe, por ejemplo, en Patel y col., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, vol. 38, pp. 219 - 223. Los expertos en la técnica entenderán a partir de la descripción proporcionada en esta memoria descriptiva y su conocimiento relacionado cómo preparar una preparación enzimática en polvo en acetona adecuada tal como se describe, por ejemplo, en Nakamura y col., *Tetrahedron Lett.*, 1996,
25 vol. 37, pp. 1629 - 1632; Nakamura y col., *Tetrahedron: Assymetry*, 2003, vol.

14, pp. 2659 - 2681.

La enzima puede ser cualquier enzima obtenible de animales, plantas, microorganismos, etc. La enzima se puede emplear en cualquier forma convencional tal como en una forma purificada, una forma bruta, una mezcla
5 con otras enzimas, un "caldo de fermentación microbiana, un caldo de fermentación, un cuerpo microbiano, un filtrado de caldo de fermentación, y similares, bien solos o en combinación. Además, la enzima o cuerpo microbiano se puede inmovilizar sobre una resina.

Además, una enzima (por ejemplo, una óxidoreductasa) de cualquier
10 microorganismo adecuado se puede usar también en los procedimientos sujetos, y esta enzima se puede aislar a partir del microorganismo mediante cualquier procedimiento conocido adecuado para los expertos en la técnica, como para el microorganismo intacto, se puede usar en el procedimiento sujeto o bien en forma libre o forma inmovilizada. Los expertos en la técnica entenderán a partir
15 de la descripción proporcionada en esta memoria descriptiva y su conocimiento relacionado cómo aislar y purificar la enzima del microorganismo adecuado tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/093477.

Las enzimas ejemplares, comercialmente disponibles adecuadas para uso en la presente invención incluyen deshidrogenasas y reductasas, que se
20 clasifican bajo E.C.1.1.1 y capaces de catalizar la reducción de grupos carbonilo, tales como, por ejemplo, un kit KRED - M27 de cetona reductasas de Biocatalytics, Inc., alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (Grunwald y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, vol. 108, pp. 6732 - 6734; Johansson y col., *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 227, pp. 551 - 555; Adolph y col., *Biochemistry*, 2000,
25 vol. 39, pp. 12885 - 12897; Wong y col., *Tetrahedron Organic Chemistry*, 1994,

vol. 12, pp. 149 - 150), alcohol deshidrogenasa de levadura, alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium brokii* y alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*.

Los sustratos naturales de las enzimas son alcoholes tales como etanol, lactato, glicerol, etc. y los compuestos carbonilo correspondientes; sin embargo, cetonas no naturales también se pueden reducir enantioselectivamente. Para mostrar actividades catalíticas, las enzimas requieren una coenzima tal como NADH o NADPH a partir de la cual se transfiere un hidruro al carbono carbonilo sustrato. Existen cuatro patrones estereoquímicos que permiten la transferencia del hidruro a partir de la coenzima, NAD(P)H, al sustrato. Con enzimas E1 y E2, el hidruro ataca la cara *si* del grupo carbonilo, mientras que con las enzimas E3 y E4, el hidruro ataca la cara *re*, que da como resultado la formación de alcoholes (R) y (S), respectivamente. Por otra parte, las enzimas E1 y E3 transfieren el hidruro pro - (R) de la coenzima, y las enzimas E2 y E4 usan el hidruro pro-(S). Los ejemplos de las enzimas E1 - E3 son como sigue:

E1: alcohol deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp.

Alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*

E2: glicerol deshidrogenasa de *Geotrichum candidum*

20 Dihidroxiacetona reductasa de *Mucor javanicus*

E3: alcohol deshidrogenasa de levadura

Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo

Alcohol deshidrogenasa de *Moraxella* sp

La evolución dirigida de enzimas se puede usar para mejorar la función reductora de las enzimas o biocatalizadores para reducción se pueden

confeccionar usando la técnica de anticuerpos catalíticos como se describe, por ejemplo, en Nakamura y col., *Tetrahedron: Assymetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659 - 2681.

Los microorganismos adecuados para uso en reducción microbiana estereoselectiva sujeto se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido para los expertos en la técnica. Un ejemplo de un procedimiento adecuado para la preparación de un microorganismo a partir de una existencia comprada comercialmente se proporciona más adelante. El procedimiento proporcionado más adelante se puede usar para cualquier microorganismo adecuado para uso en el procedimiento de la presente invención, y los expertos en la técnica entenderán a partir de la descripción proporcionada en esta memoria descriptiva cómo modificar cualquier parte del procedimiento, por ejemplo, procedimiento de preparación del microorganismo, libre o inmovilizado, lavado o no lavado; procedimiento de contacto de la cantidad del sustrato con el microorganismo; componentes y condiciones de medio de crecimiento, por ejemplo, temperatura, pH y similares; o condiciones de incubación, para lograr el resultado deseado en cualquier procedimiento particular.

Los expertos en la técnica entenderán a partir de la descripción proporcionada en esta memoria descriptiva cómo preparar microorganismo inmovilizado adecuado tal como se describe, por ejemplo, en Bauer y col., *Biotechnol. Lett.*, 1996, 18, pp. 343 - 348 o enzima inmovilizada adecuada tal como se describe, por ejemplo, en Svec, F.; Gemeiner, P. "Engineering aspects of carriers for immobilized biocatalysts." *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 1996, vol. 13, pp. 217 - 235.

Cualquier procedimiento adecuado de poner en contacto la cantidad del sustrato con el microorganismo o sistema de reducción enzimático se puede usar en la presente invención. El sustrato se puede poner en contacto con el microorganismo o el sistema de reducción enzimático en cualquier orden
5 adecuado. Por ejemplo, el sustrato se puede añadir a un medio, tal como un caldo de cultivo, que comprende el microorganismo, libre o inmovilizado, o alguna combinación del mismo; o el medio puede comprender el sustrato y el microorganismo se puede añadir después a tal medio; o el sustrato y el microorganismo se pueden añadir juntos a tal medio; o el sustrato se puede
10 añadir a una preparación de células rotas del mismo; o el sustrato se puede añadir a una preparación deshidratada del microorganismo; o bien el sustrato o el microorganismo o sistema de reducción enzimática se puede añadir a un disolvente adecuado que comprende el otro; y similares. Por ejemplo, el sistema de reducción enzimático se puede añadir a un disolvente
15 apreciablemente orgánico con el contacto produciéndose mediante la adición del sustrato a ese disolvente. Los expertos en la técnica también entenderán basándose en la presente descripción cómo poner en contacto mediante la adición del sustrato adsorbido a una resina. Además, los expertos en la técnica entenderán a partir de la descripción proporcionada en esta memoria
20 descriptiva cómo modificar cualquier parte del procedimiento sujeto según se desee.

Para el procedimiento según la invención, los microorganismos se pueden cultivar primero en condiciones limitadas de nitrógeno y, después de recoger las células, por ejemplo, mediante centrifugación, usarse para el
25 procedimiento según la invención. La reducción se puede llevar a cabo con

células enteras, digestiones de células o extractos de enzimas brutas obtenidas a partir de las células o enzimas purificadas. El procedimiento se puede llevar a cabo en medio acuoso en presencia de una fuente de carbono en el caso de células enteras o de un agente reductor tal como NADH o NADPH y de un cofactor que se recicla, tal como con la ayuda de formiato deshidrogenasa y ácido fórmico, y, cuando sea apropiado, otras enzimas en el caso de digestiones celulares, extractos brutos o enzimas puras. La adición de nutrientes adicionales en la reducción con células enteras, tal como una fuente de nitrógeno, vitaminas o fosfatos, es inoportuna debido a que se observan reacciones secundarias no deseadas en estas condiciones, por ejemplo, que pueden dar como resultado calidad de producto deficiente u otros problemas de tratamiento. Adecuados como fuente de carbono para el microorganismo son todas fuentes de carbono capaces de proporcionar las células con los equivalentes necesarios para la reducción. Los ejemplos de fuentes de carbono que se pueden mencionar en esta memoria descriptiva son mono- o disacáridos tales como glucosa, manosa, maltosa, sacarosa, alcoholes primarios o secundarios tales como metanol, etanol, propanol, polioles tales como glicerol, ácidos carboxílicos inferiores tales como ácido láctico, ácido málico o aminoácidos tal como glutamato. La conversión del precursor con microorganismos en solución acuosa en presencia de una fuente de carbono tiene la ventaja de que ni el precursor ni el producto se metaboliza y no se forman subproductos.

La reacción de bio - reducción se puede llevar a cabo en agua pura o en tampones acuosos sin adición de otros disolventes o mezclas de disolventes. Para mejorar la solubilidad del precursor, 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona,

XII
10

es posible añadir disolventes orgánicos miscibles en agua tales como tetrahidrofurano, acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, alcoholes primarios o secundarios, ácidos carboxílicos, lactonas tal como γ -butirolactona, que son capaces de mejorar la solubilidad del precursor, 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona, a la reacción.

La reacción se puede llevar a cabo a entre 0°C y 50°C, preferiblemente entre 10°C y 45°C, particular y preferiblemente entre 15°C y 40°C.

Los tiempos de reacción dependen de microorganismo o enzima y están entre 1 y 72 horas, preferiblemente entre 1 y 48 horas.

10 Cualquier duración adecuada de crecimiento del microorganismo, poniendo en contacto el microorganismo con la cantidad de sustrato, e incubación del sustrato con el microorganismo se puede usar en la presente invención. Se puede lograr crecimiento adecuado del microorganismo, por ejemplo, dentro de aproximadamente 24 horas, 48 horas, o 72 horas, tiempo en
15 el que se puede añadir al cultivo una alícuota adecuada de una solución de la cantidad del sustrato en un disolvente adecuado, preferiblemente etanol. Después la fermentación se puede continuar durante, por ejemplo entre aproximadamente dos a aproximadamente seis días, y preferiblemente, por ejemplo, durante aproximadamente cinco días. El progreso de la reacción se
20 puede seguir fácilmente mediante procedimientos convencionales después de la extracción del producto con un disolvente orgánico. El caldo de fermentación se puede extraer usando cualquier procedimiento de extracción adecuado, por el que, por ejemplo, un disolvente adecuado, tal como, por ejemplo, acetato de etilo, metilisobutilcetona, metiletilcetona, cloruro de metileno, y similares,
25 preferiblemente, acetato de etilo, retira los componentes orgánicos del caldo de

11/12

fermentación. También se puede usar metanol para extraer material de las células en la mezcla metanol - agua. Después de la extracción del caldo de fermentación y separación de las fases orgánica y acuosa, los compuestos que comprenden el residuo orgánico se pueden determinar usando cualquier
5 procedimiento adecuado, tal como, por ejemplo, cromatografía, preferiblemente, HPLC quiral.

La reacción preferiblemente se lleva a cabo en condiciones aerobias, es decir, con aireación en el caso de conversión con microorganismos, preferiblemente con aireación suave. Sin embargo, también es posible la
10 conversión en condiciones anaerobias. El procedimiento se puede llevar a cabo de forma continua o por lotes.

El producto a partir de cualquiera de las anteriores reacciones se puede purificar mediante separación por fases y/o extracción en un disolvente adecuado, tal como diclorometano y después, si se requiere, se puede
15 cromatografiar.

Las reacciones anteriormente mencionadas también se pueden llevar a cabo usando procedimientos de producción en continuo que implica reciclado continuo de la fase orgánica en la reacción o inmovilización de las células y el paso del sustrato en solución orgánica sobre la biomasa inmovilizada en una
20 columna, reactor de bucle u otro reactor similar.

Por lo tanto, como entenderían los expertos en la técnica, variación del medio de crecimiento, las condiciones de fermentación, y/o condiciones de la reducción (por ejemplo, la temperatura, pH, y la cantidad de sustrato) se pueden alterar para controlar el rendimiento de los compuestos resultantes y
25 sus velocidades relativas de producción. En general, las técnicas empleadas en

143
12

la presente invención se elegirán con relación a la eficacia industrial. El medio de crecimiento, condiciones de fermentación y cantidades relativas de microorganismo, o sistema de reducción enzimática, y del sustrato descrito en esta memoria descriptiva, son meramente ilustrativos de la amplia variedad de medios, condiciones de fermentación y cantidades de materiales de partida que se pueden emplear adecuadamente en la presente invención como apreciarían los expertos en la técnica, y no pretenden limitarla de ninguna manera.

Cualquier procedimiento adecuado para aislar y/o purificar cualquiera de los productos de los procedimientos sujetos se puede usar en la presente invención incluyendo filtración, extracción, cristalización, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina cromatografía líquida de baja presión preparativa o HPLC, o cualquier combinación adecuada de tales procedimientos.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. La descripción anterior y siguiente de la presente invención y las diversas realizaciones no se proponen ser limitantes de la invención sino más bien son ilustrativos de la misma. Por lo tanto, se entenderá que la invención no se limita a detalles específicos de estos ejemplos.

20

EJEMPLOS

Materiales

Se obtuvieron placas de 96 pocillos y accesorios adecuados de VWR international. Los instrumentos analíticos que incluyen la Tecan Genesis 2000 Workstation (Research Triangle Park, NC), automuestreador de HPLC Agilent 220 y 6890N GC (Agilent Technologies, CA), SpectraMax Plus 384 (Molecular

134
113

Devices, USA), Beckman Coulter P/ACE MDQ (Fullerton, CA), y Waters/Micromass ZQ CL/EM (Waters, MA) se compraron a sus proveedores respectivos. El termomezclador - R Eppendorf se compró en VWR. Se obtuvieron columnas de HPLC quiral usadas en el análisis de Chiral Technologies (Exton, PA) y Phenomenex (Torrance, CA).

La mayoría de enzimas utilizadas en la placa de selección se obtuvieron de diversos proveedores de enzimas incluyendo Amano (Nagoya, Japón), Roche (Basel, Suiza), Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca), Altus Biologics Inc. (Cambridge, MA), Biocatalytics (Pasadena, CA), Toyobo (Osaka, Japón), Sigma y Fluka. La tabla 1 ilustra fuentes de enzimas específicas que corresponden a cada enzima. El kit de actividad de lipasa - PS se compró en Sigma. La esterasa de hígado de cerdo comercialmente disponible se compró en Biocatalytics (Pasadena, CA) en forma de una suspensión de sulfato amónico bruto bajo el nombre de PLE AS (nº de catálogo ICR - 123).

La mayoría de los disolventes utilizados durante la optimización se obtuvo de EM Science (Gibbstown, NJ) y eran de la pureza más alta disponible.

Procedimientos de HPLC

El análisis de HPLC de las muestras seleccionadas se realizó sobre una Agilent 1100 HPLC con automuestreador de 96 pocillos. Las reacciones de realizaron en un termomezclador - R Eppendorf (VWR).

Cada muestra de HPLC se preparó tomando 2 x 50 µl de la mezcla de reacción, después se combinaron y se diluyeron con 2 ml de acetonitrilo. Se diluyeron posteriormente 100 µl de esa solución con 400 µl de acetonitrilo y se inyectaron en la HPLC.

Procedimiento de HPLC no quiral

25
114

Usando detector de longitud de onda de 254 nm; columna Phenomenex luna C 18 , 3 μ m, C18, 4,6 x 30 mm; caudal 2,0 ml/min; volumen de inyección: 5 μ l; fases móviles: A: agua - ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% B: acetonitrilo - TFA al 0,1%; las muestras se desarrollaron sobre el gradiente (0,5 minutos 5 después del desarrollo)

	Tiempo	% de B	% de C	% de D
1	0,00	5,0	0,0	0,0
2	1,67	65,0	0,0	0,0
3	2,00	95,0	0,0	0,0
10 4	2,50	95,0	0,0	0,0
5	2,60	5,0	0,0	0,0
6	3,00	5,0	0,0	5,0

Procedimientos de HPLC quiral

15 Alcohol 1: usando detector de longitud de onda: 254 nm; Chiracel ADR - H, 3 μ m, C18, 4,6 x 150 mm; caudal 0,8 ml/min; volumen de inyección 10 μ l; fases móviles: A: agua B: acetonitrilo; isocrático: 50% de B durante 15 minutos.

Acetato 2: procedimiento quiral usando detector de longitud de onda: 254 nm; Chiralcel OJ - RH, 3 μ m, C18, 4,6 x 150 mm; caudal 0,6 ml/min: 20 volumen de inyección 10 μ l; fases móviles: A: agua B: acetonitrilo; isocrático: 50% de B durante 15 minutos.

Preparación de placas de selección

Se ha llevado a cabo la preparación de placas de selección según 25 Yazbeck y col., *Adv. Synth. Catal.*, 2003, vol. 345, pp. 524 - 532.

H2
15

Específicamente, la preparación usualmente lleva del orden de 1 - 2 días y conlleva la preparación de soluciones madre de enzimas (100 mg/ml) y la dispensación de estas soluciones madre en placas de selección de 96 pocillos, o "kits de selección". La dispensación de estas soluciones madre en una placa de selección se lleva a cabo mediante un puesto de trabajo manipulador de líquido automático, que se programó para dispensar exactamente 10 µl de cada enzima individual en el lugar adecuado en cada placa de 96 pocillos.

Cuando se elige un formato de placa de 96 pocillos, las placas necesitan ser resistentes a tanto disolvente como temperatura, por lo tanto, se recomienda el uso de placas de polipropileno. El volumen y morfología de placa también tienen que considerarse. Las reacciones en esta memoria descriptiva se llevan a cabo en volúmenes de reacción de 100 µl en placas no mayores de 500 µl. Las placas de fondo en V tienden a mejorar la agitación de la solución y permiten muestreo más limpio después de centrifugación.

Una vez que se preparan las placas, se pueden sellar con cualquier hoja delgada adhesiva o con una cubierta mate penetrable y almacenarse a -80°C durante meses o incluso años.

En los casos en los que se requieren condiciones anhidras, tales como reacciones de acilación y amidación, las placas de selección se deben liofilizar antes de uso. Con el fin de retirar el agua de cada pocillo, la placa se liofiliza durante 10 a 24 horas en una cámara a temperatura de -20°C. Después de la liofilización, las placas se pueden almacenar a de 4 a 8 °C.

Procedimiento de selección de enzimas

La resolución de acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo se llevó a

cabo como sigue. Una placa de 96 pocillos preparada como se ha descrito anteriormente se descongeló durante cinco minutos. Después se dispensaron 80 µl de tampón fosfato de potasio (0,1 M, pH 7,2) en los pocillos usando una pipeta multi - canal. Después se añadieron 10 µl de la solución madre de sustrato (50 mg/ml de acetonitrilo) a cada pocillo mediante una pipeta multi - canal, y las 96 reacciones se incubaron a 30°C y 750 rpm. Las reacciones se muestrearon después de 16 horas mediante la transferencia de 25 µl de la mezcla de reacción en una nueva placa de 96 pocillos, que después se inactivó mediante la adición de 150 µl de acetonitrilo. Después la placa de 96 pocillos se centrifugó, y el sobrenadante orgánico se transfirió de cada pocillo en otra placa de 96 pocillos. Después las reacciones muestreadas se sellaron usando una cubierta mate penetrable y se transfirieron a un sistema de HPLC para análisis. La misma placa se usó para analizar las muestras respecto a tanto la reactividad como la enantioselectividad usando columnas alternas sobre la HPLC simultáneamente.

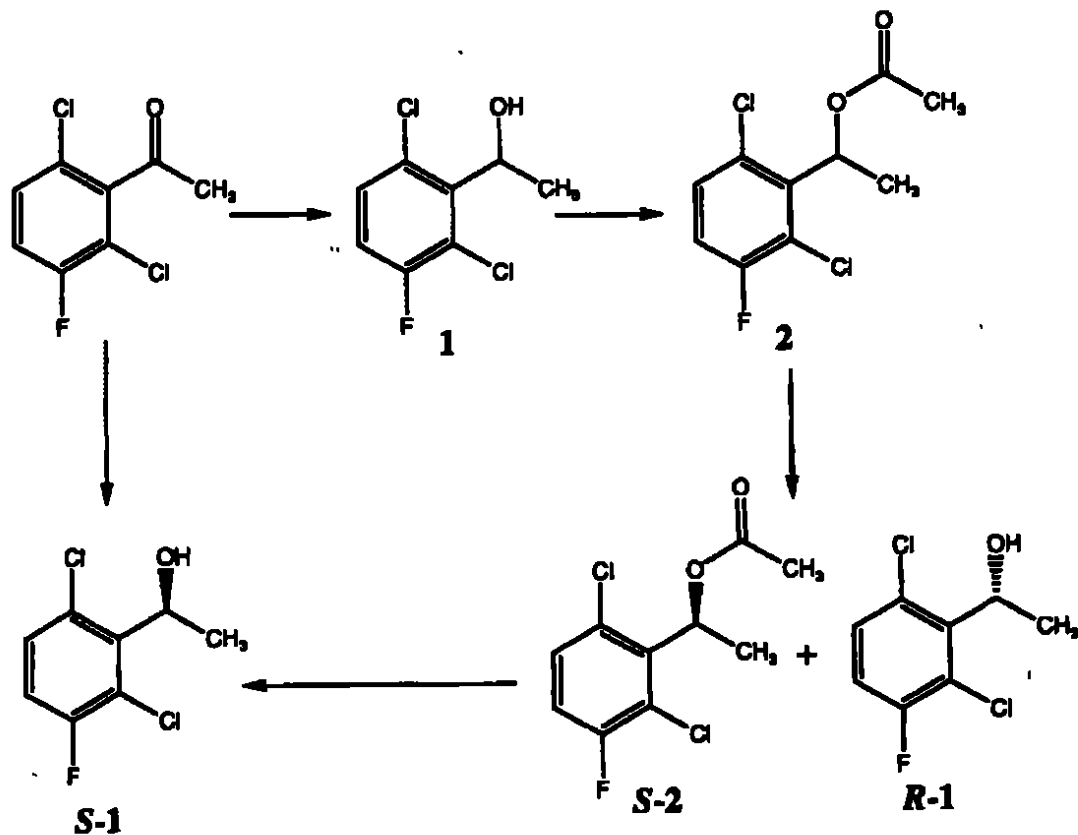
EJEMPLO 1

Preparación de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol ópticamente activo mediante combinación de resolución enzimática y transformación química

Para propósitos ilustrativos solamente, el procedimiento de la presente invención se demuestra mediante el siguiente ejemplo de biotransformación de un acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo racémico, cuya biotransformación se representa en el esquema 1.

Esquema 1

117-40



Resolución enzimática de acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo (2)

El procedimiento implicó la realización de cuatro etapas principales:

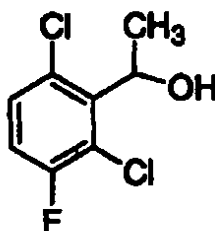
- 5 1) preparar el acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo racémico
- 2) seleccionar enzimas usando las lipasas, proteasas y esterasas comercialmente disponibles;
- 3) optimizar las condiciones de reacción tales como pH, temperatura y cantidad de enzima y sustrato; y
- 10 4) maximizar el rendimiento del procedimiento de resolución enzimático desarrollando un procedimiento para la combinación de hidrólisis enzimática, esterificación e hidrólisis química con inversión.

118
49

1) Preparación de acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo
racémico (compuesto 2)

Compuesto 1

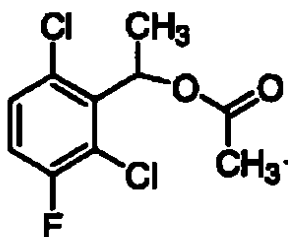
5 **1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol**



Se añadió borohidruro de sodio (90 mg, 2,4 mmoles) a una solución de 2',6'-dicloro-3'-fluoroacetofenona (Aldrich, nº de catálogo 52.294 - 5) (207 mg, 1 mmol) en 2 ml de CH₃OH anhidro. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora después se evaporó proporcionando un residuo oleoso incoloro. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 0 → 10% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto 1 en forma de un aceite incoloro (180 mg, 0,88 mmoles; 86,5% de rendimiento); EM (IQPA) (M - H)⁺ 208; ¹H RMN (cloroformo - D, 400 MHz) δ ppm 1,64 (d, J = 6,82 Hz, 3 H), 3,02 (d, J = 9,85 Hz, 1 H), 6,97 - 7,07 (m, 1 H), 7,19 - 7,33 (m, 1 H).

Compuesto 2

20 **Acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo**



Se añadieron anhídrido acético (1,42 ml, 15 mmoles) y piridina (1,7 ml, 21 mmoles) secuencialmente a una solución del compuesto 1 (2,2 g, 10,5 mmoles) en 20 ml de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y después se evaporó proporcionando un residuo oleoso amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 7 → 9% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto 2 en forma de un aceite incoloro (2,26 g, 9,0 mmoles; 85,6% de rendimiento); ¹H RMN (cloroformo - D, 400 MHz) δ ppm 1,88 (d, *J* = 6,82 Hz, 3 H), 2,31 (s, 3H), 6,62 (c, *J* = 6,82 Hz, 1 H), 7,25 (t, *J* = 8,46 Hz, 1 H), 7,49 (dd, *J* = 8,84, 5,05 Hz, 1 H).

2) Selección de enzimas

El catalizador más adecuado para la resolución cinética de acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo racémico (compuesto 2) se identificó después de seleccionar una colección de hidrolasas comercialmente disponibles. Un procedimiento de selección de enzimas general se usó para seleccionar 94 enzimas comercialmente disponibles representadas en la tabla 1.

12/01

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	PGRD9	PGRD17	PGRD25	PGRD33	PGRD41	PGRD49	PGRD57	PGRD65	PGRD73	PGRD81	PGRD89
B	Blank	PGRD10	PGRD18	PGRD26	PGRD34	PGRD42	PGRD50	PGRD58	PGRD66	PGRD74	PGRD82	PGRD90
C	PGRD3	PGRD11	PGRD19	PGRD27	PGRD35	PGRD43	PGRD51	PGRD59	PGRD67	PGRD75	PGRD83	PGRD91
D	PGRD4	PGRD12	PGRD20	PGRD28	PGRD36	PGRD44	PGRD52	PGRD60	PGRD68	PGRD76	PGRD84	PGRD92
E	PGRD5	PGRD13	PGRD21	PGRD29	PGRD37	PGRD45	PGRD53	PGRD61	PGRD69	PGRD77	PGRD85	PGRD93
F	PGRD6	PGRD14	PGRD22	PGRD30	PGRD38	PGRD46	PGRD54	PGRD62	PGRD70	PGRD78	PGRD86	PGRD94
G	PGRD7	PGRD15	PGRD23	PGRD31	PGRD39	PGRD47	PGRD55	PGRD63	PGRD71	PGRD79	PGRD87	PGRD95
H	PGRD8	PGRD16	PGRD24	PGRD32	PGRD40	PGRD48	PGRD56	PGRD64	PGRD72	PGRD80	PGRD88	PGRD96

Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
1	Blanco [Tampón]	Blanco
2	Blanco [ACN]	Blanco
3	Lipasa pancreática porcina	Altus 03
4	CALA, Iyo	Altus 11
5	Lipasa de Candida lipolytica	Altus 12
6	CALB, Iyo	Altus 13
7	Lipasa de Geotrichum candidum	Altus 28
8	Lipasa de Pseudomonas aeruginosa	Altus 50
9	Lipasa de Aspergillus niger	Lipasa A de Amano
10	Lipasa de Pseudomonas cepacia	Lipasa AH de Amano
11	Lipasa de Pseudomonas fluorescens	Lipasa AK de Amano
12	Lipasa de Candida rugosa	Lipasa AY de Amano
13	Lipasa de Rhizopus delemar	Lipasa D de Amano
14	Lipasa de Rhizopus oryzae	Lipasa F de Amano

12/12

Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
15	Lipasa de <i>Penicillium camembertii</i>	Lipasa G de Amano
16	Lipasa de <i>Mucor javanicus</i>	Lipasa M de Amano
17	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipasa PS de Amano
18	Lipasa de <i>Penicillium roqueforti</i>	Lipasa R de Amano
19	Proteasa de <i>Aspergillus</i> sp.	BioCatalytics 101
20	Lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp.	BioCatalytics 103
21	Lipasa fúngica	BioCatalytics 105
22	Lipasa microbina, Iyo	BioCatalytics 108
23	CALB, Iyo	BioCatalytics 110
24	<i>Candida</i> sp., Iyo	BioCatalytics 111
25	CALA, Iyo	BioCatalytics 112
26	Lipasa de <i>Thermomyces</i> sp.	BioCatalytics 115
27	Lipasa de <i>Alcaligenes</i> sp., Iyo	BioCatalytics 117
28	Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	Altus 26
29	CalB, L2 Sol	Chriazyme L2 Sol
30	Lipasa de <i>Candida utilis</i>	Fluka6
31	Lipasa de <i>Rhizopus niveus</i>	Sigma L8

Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
32	Lipoproteína Lipasa de Pseudomonas species	Sigma L13
33	Lipasa de Thermomuces lanuginosus	Sigma L9 Lipolasa
34	Lipasa de Thermomuces lanuginosus	Sigma L10 Novo871
35	Lipasa de Rhizomucor miehei	Sigma L6 Patalasa
36	Lipasa de Pseudomonas species	Sigma L14 Tipo XIII
37	Lipasa de germen de trigo	Sigma L11
38	Lipasa de Rhizopus arrhizus	Sigma L7 Tipo XI
39	Lipasa pancreática 250	Valley Research V1
40	Tripsina proteasa	Altus 33
41	Quimopapaína proteasa	Altus 38
42	Bromelaína proteasa	Altus 40
43	Proteasa de Aspergillus niger	Altus 41
44	Proteasa de Aspergillus oryzae	Altus 42
45	Proteasa de Penicillium species	Altus 43
46	Proteasa de Aspergillus sp.	Altus 45
47	Renina Proteasa de estómago de ternera	Sigma P24

12A
12B

Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
48	Subtilisina Carlsberg	Altus 10
49	Proteasa de Bacillus lentus	Altus 53
50	Proteasa de Aspergillus niger	Proteasa A ácida de Amano
51	Proteasa de Rhizopus niveus	Proteasa II ácida de Amano
52	Proteasa de Rhizopus niveus	Newlasa F de Amano
53	Proteasa de Rhizopus oryzae	Peptidasa R de Amano
54	Proteasa de Bacillus subtilis	Proleather FGF de Amano
55	Proteasa de Aspergillus oryzae	Proteasa A de Amano
56	Proteasa de Aspergillus oryzae	Proteasa M de Amano
57	Proteasa de Bacillus subtilis	Proteasa N de Amano
58	Aspergillus melleus	Proteasa P de Amano
59	Proteasa de Bacillus stearothermophilus	Proteasa SG de Amano
60	Esterasa de hígado de cerdo, Iyo	BioCat Chirazyme E1
61	Esterasa de hígado de cerdo, Iyo	BioCat Chirazyme E2
62	Proteasas de Streptomyces sp.	BioCatalytics 118

175
124

Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
63	Proteasa de Tritirachium album	Proteinasa K de Fluka P6
64	Proteasa de páncreas bovino	Alfaquimotripsina I de Sigma P18
65	Proteasa de Streptomyces griseus	Bacteriana Sigma P 16
66	Proteasa de páncreas bovino	Betaquimotripsina Sigma P 21
67	Proteasa de Clostridium histolyticum	Clostripaína Sigma P 13
68	Proteasa de intestino bovino	Enteropeptidasa Sigma P 17
69	Proteasa de intestino porcino	Enteropeptidasa Sigma P 25
70	Proteasa de Bacillus species	Esperasa Sigma P 8
71	Proteasa de Aspergillus oryzae	Flavourzyme Sigma P 1
72	Proteasa de Bacillus amyloliquefaciens	Neutrassa Sigma P 5
73	Proteasa de Carica papaya	Papaína Sigma P 12
74	Bacillus thermoproteolyticus rokko	Proteasa Sigma P 10

126
125

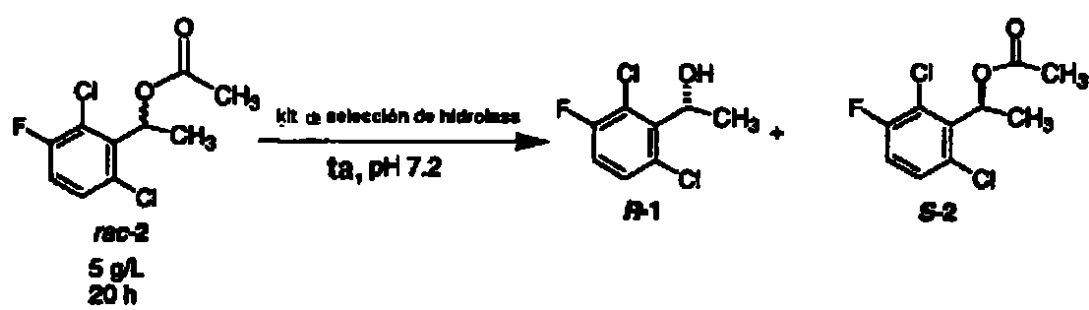
Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
75	Proteasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>	Proteasa S Sigma P 14
76	Proteasa de <i>Bacillus species</i>	Savinasa Sigma P 9
77	Proteasa de páncreas bovino	Sigma P 19 tipo 1 (bruta)
78	Proteasa de <i>Bacillus polymyxa</i>	Sigma P 7 Tipo IX
79	Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma P 6 Tipo VIII
80	Proteasa de <i>Aspergillus saitoi</i>	Sigma P 3 Tipo XIII
81	Proteasa de <i>Aspergillus sojae</i>	Sigma P 4 Tipo XIX
82	Proteasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma P 2 Tipo XXIII
83	Protesa bacteriana	Sigma P 11 tipo XXIV
84	Newlase de <i>Rhizopus species</i>	Sigma 15 Newlase
85	Validasa FP Conc	Valley 05
86	Bromelian Conc	Valley 10
87	Acilasa de <i>Aspergillus Sp.</i>	Amano Am1
88	Acilasa de riñón porcino	Acilasa I Sigma A - S2
89	Penicilina G acilasa	Altus 06
90	Esterasa de <i>Mucor meihei</i>	Fluka
91	Esterasa de <i>Candida rugosa</i>	Altus 31

127
126

Nº de PGRD	Enzima	Código de proveedor
92	Elastasa pancreática porcina	Altus 35
93	Colesterol esterasa	Biocatalytics
94	PLE sulfato amónico	Biocatalytics 123
95	Esterasa de hígado de conejo	Sigma ES2
96	Colesterolesterasa de Pseudomonas flu.	Sigma ES4

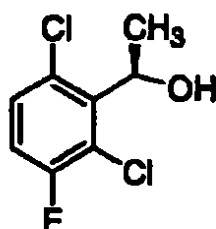
Después de la selección inicial usando carga de sustrato al 5% en tampón fosfato de potasio 100 mM a pH 7,2, se identificaron varias hidrolasas como éxitos para la hidrólisis enzimática del éster del alcohol racémico 2 a alcohol R-1 (esquema 2).

Esquema 2



Compuesto R-1

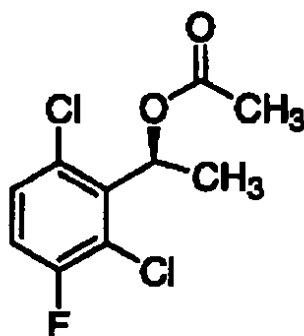
(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol

128
128

El compuesto **R-1** se purificó a partir del compuesto **S-2** mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 15 → 17% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto **R-1** en forma de un aceite incoloro (92,7 mg; 0,45 mmoles).

Compuesto S-2

Acetato de (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo



10

El compuesto **S-2** se purificó a partir del compuesto **R-1** mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 9 → 10% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto **S-2** en forma de un aceite incoloro (185,9 mg; 0,74 mmoles).

15 Como se muestra en la tabla 2, varias enzimas mostraron actividad hacia acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo (2). El análisis de los valores E reveló que cinco de aquellas enzimas mostraban buena enantioselectividad de

129
128

valor E mayor de 100. Tanto la lipasa de *Rhizopus delemar* como la esterasa de hígado de cerdo (PLE) mostraron valores de E > 150. Sin embargo, PLE mostró la más alta reactividad hacia acetato de (R) 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo ((R)-2).

5

Tabla 2

Enzimas	Valor de E	Reactividad
Selectiva para hidrólisis de acetato (R)		
Lipasa B (CAL - B) de <i>Candida antarctica</i> , esterasa de hígado de cerdo (PLE), lipasa de <i>Rhizopus delemar</i> , acilasa de riñón porcino, colesterol esterasa	Alto (> 100)	Alta
Proteasa intestinal bovina, proteasa P6 tipo VIII de Sigma, lipasa de <i>Candida rugosa</i>		Baja
Lipasa de <i>Rhizopus orizae</i> , lipasa de <i>Penicillium camembertii</i> , lipasa de <i>Pseudomonas sp.</i> lipasa de <i>Thermomyces sp.</i> , lipasa de <i>Alcaligenes sp.</i> , lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i> , lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> , lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus.</i> , lipasa de germen de trigo, Bromelain proteasa, proteasa de <i>Aspergillus niger</i> , proteasa de <i>Rhizpus niveus</i> , proteasa	Bajo (< 20)	Baja

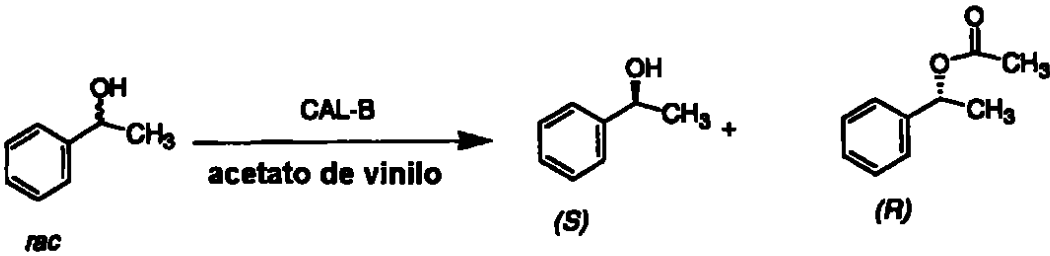
130
129

Enzimas	Valor de E	Reactividad
de <i>Aspergillus saitoi</i> , acilasa de <i>Aspergillus</i> sp.		
Selectiva para la hidrólisis de acetato (S)		
Lipasa A de <i>Candida antarctica</i> (CAL - A), Subtilisina Carlsberg (proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>), Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	Bajo (< 10)	Baja
Proteasa de <i>Rhizopus delemar</i>		Alta

La configuración absoluta de alcohol (1) generado a partir de la hidrólisis con PLE se asignó inicialmente por comparación con una reacción conocida de un sustrato similar como se muestra en el esquema 3 y se describe en

5 Bouzemi, N. y col, *Tetrahedron Letters*, 2004, pp. 627 - 630.

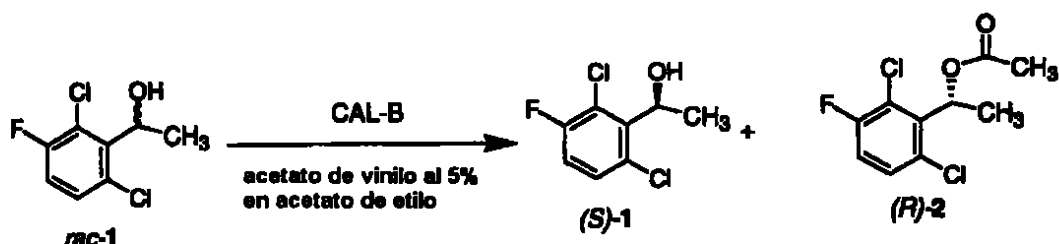
Esquema 3
Reseña bibliográfica



10 Ensayado en el laboratorio y asignado (asumiendo que la enzima no

131
130

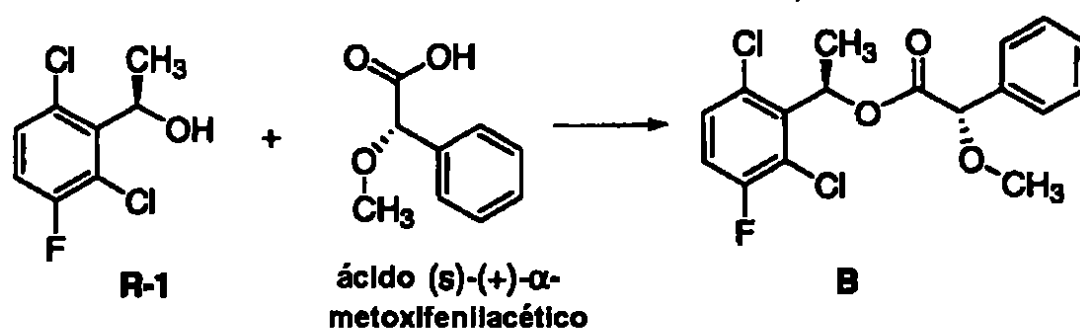
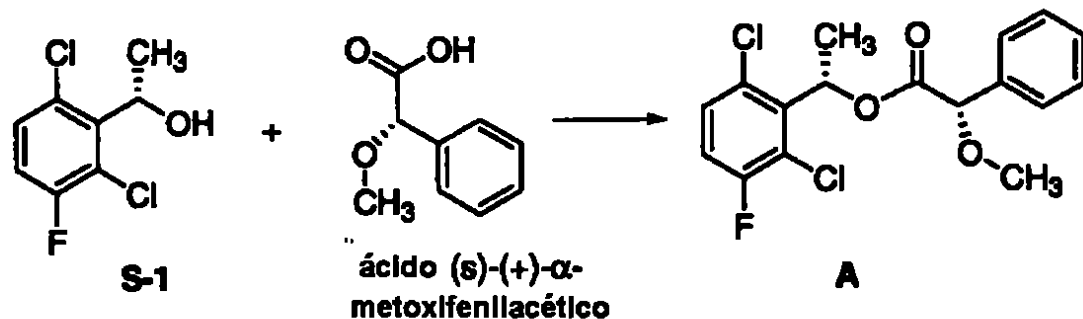
cambia el patrón de reconocimiento)



Como se muestra en el esquema 3, la acilación enzimática de 1-
 5 feniletanol usando CAL - B produjo el enantiómero R de acetato de 1-feniletilo
 que deja el enantiómero S sin reaccionar de 1-feniletanol (Bouzemi, N. y col.,
Tetrahedron Letters, 2004, pp. 627 - 630). Se puede asumir que cuando CAL -
 B se hace reaccionar con *rac*-1, el reconocimiento de sustrato debe ser el
 mismo; de acuerdo a lo anterior, el producto éster obtenido se denominó
 10 enantiómero R.

Cuando se compara con el compuesto obtenido en la hidrólisis
 enzimática de *rac*-1 con PLE (reacción opuesta), se observó el isómero R del
 alcohol, que procedía claramente de la hidrólisis del acetato R.

Una determinación directa de la configuración absoluta del alcohol (1)
 15 generado a partir del producto de hidrólisis con PLE se puede basar en la
 determinación por RMN del diastereoisómero producido a partir de los esteres
 de Mosher.

132
131

El compuesto A y el compuesto B se sintetizaron usando procedimientos indicados en la bibliografía en *Tetrahedron: Asymmetry* 2002, vol. 13. p. 2283; *Tetrahedron Lett.* 1988, vol. 29. p. 6211. Estos dos compuestos se sometieron a experimentos de ^1H RMN y los desplazamientos químicos de los grupos metilo de tanto el compuesto A como el compuesto B se comparan para determinar que el compuesto A tiene la configuración "S" y el compuesto "B" tiene la configuración "R".

Síntesis del compuesto A: DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) (1,1 mmol) se añadió a una solución de ácido (s)-(+)-α-metoxifenilacético (1 mmol) en 5 ml de THF anhidro. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. El compuesto S-1 (1 mmol) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) (0,2 mmol) se añadieron

132

secuencialmente a la mezcla de reacción y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 36 horas. La mezcla se evaporó, se trituro en metanol, se filtró, y se concentró para conseguir un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC proporcionando el compuesto A.

- 5 **Síntesis del compuesto B:** DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) 1,1 mmoles) se añadió a una solución de ácido (s)-(+)- α -metoxifenilacético (1 mmol) en 5 ml de THF anhidro. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. El compuesto R-1 (1 mmol) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) (0,2 mmoles) se añadieron
- 10 secuencialmente a la mezcla de reacción y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 36 horas. La mezcla se evaporó, se trituro en metanol, se filtró, y se concentró para conseguir un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC proporcionando el compuesto B.

15 3) Optimización de las condiciones de reacción usando PLE - AS

- PLE es una enzima producida por Roche y vendida a través de Biocatalytics Inc. como una preparación de estearasa bruta de hígado de cerdo, conocida comúnmente como PLE AS (comprada en Biocatalytics como ICR - 123, vendida en forma de una suspensión de sulfato amónico). La
- 20 enzima se clasifica en el registro CAS como una "éster carboxílico hidrolasa, CAS nº 9016 - 18 - 6". El número de clasificación de enzima correspondiente es EC 3.1.1.1. Se sabe que la enzima tiene una amplia especificidad de sustrato hacia la hidrólisis de un amplio intervalo de ésteres. La actividad lipasa se determina usando un procedimiento basado en la hidrólisis de butirato de etilo
- 25 en un ajustador de pH. 1 LU (unidad lipasa) es la cantidad de enzima que libera

134
133

1 μ mol ajustable de ácido butírico ajustable por minuto a 22°C, pH 8,2. La
preparación reseñada en esta memoria descriptiva (PLE - AS, como
suspensión) se envía usualmente como un líquido marrón - verde opaco con
una actividad declarada de > 45 LU/mg (contenido proteico aproximadamente
5 40 mg/ml).

Los principales parámetros optimizados en esta reacción eran las
concentraciones de sustrato y concentraciones de enzima, pH, y tipo de
tampón. La mayoría de los experimentos se realizaron usando la forma líquida
de la enzima comercialmente disponible como PLE - AS. El efecto del pH en
10 esta reacción no era muy crítico. Un intervalo razonable de pH para realizar la
reacción incluye pH 6 - 9 con resultados óptimos a pH 8,0. La mayoría de los
experimentos de optimización se realizaron después a temperatura ambiente.
Se ensayaron tampones: Tris, fosfato y acetato de calcio. La reacción se puede
realizar en los tres tampones con resultados muy similares en el intervalo entre
15 10 y 100 mM de concentración. Se pueden usar otros tampones para llevar a
cabo la reacción que incluyen ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES),
piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N,N-bis(2-
hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 3-(N-
morfolino)propanosulfónico (MOPS), N-(2- hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-
20 etanosulfónico) (HEPES), ácido N-tris (hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
(TES), tris(hidroximetil)aminometano (TRIZMA), N-tris(hidroximetil)metilglicina
(TRICINA), N,N-bis(2- hidroxietil)glicina (BICINA), ácido N-
tris(hidroximetil)metil-3- aminopropanosulfónico (TAPS), o cualquier otro
tampón con valores de pKa entre 6 y 9. Se usaron velocidades de agitación
25 normales en todos los experimentos (500 - 1000 rpm). Se encontró que un

135
134

contenido en enzima de 5 - 10% (v/v) podría catalizar eficazmente la reacción enzimática casi tan eficaz como 20%. La premezcla de enzima y tampón seguido de adición de sustrato y agitación fuerte se encontró que era beneficioso para realizar la reacción a concentraciones mínimas. Usando las

5 condiciones optimizadas para cargas de enzimas se ensayaron, cargas de sustratos entre 0,2 M y 2 M y se encontró que concentraciones entre 1 - 2 M producían cerca de un 50% de conversión en 24 horas. Otras formas de la enzima no comercialmente disponibles también se podrían usar, aquellas incluyen inmovilizadas sobre soporte sólido (tales como cerámica, celita,

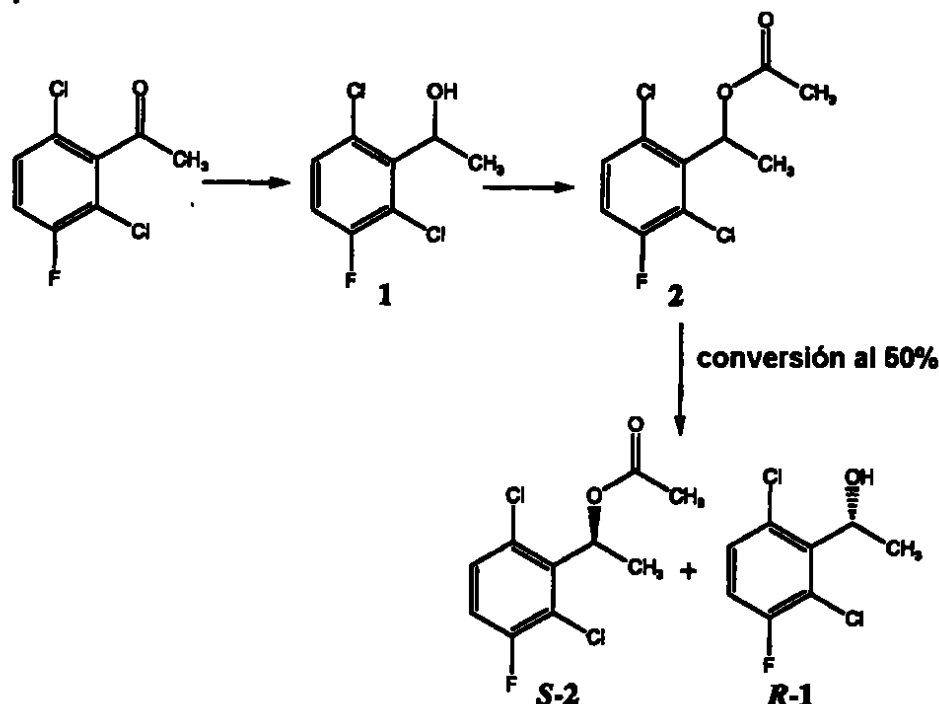
10 Eupergit, perlas acrílicas, etc), cristales de enzimas reticuladas (CLEC), o agregados de enzimas reticuladas (CLEA), gránulos de sulfato amónico, o cualquier otra forma en la que la actividad y enantioselectividad se puede preservar o potenciar.

La preparación a gran escala de los compuestos R-1 y S2 usando

15 resolución con esterasa de hígado de cerdo de acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo racémico (2) se realizó según el esquema 4.

136
135

Esquema 4



A un reactor de 5 l equipado con un electrodo de pH, un agitador en la parte superior y una línea de adición de base se añadió la solución de PLE - AS
 5 (0,125 l) y 2,17 l de solución de tampón fosfato potásico. Se usó un ajustador de pH 718 Stat Tritino - Metrohm (Brinkman instruments, Inc) para realizar la reacción. La solución de tampón fosfato potásico se preparó mezclando 2,17 l de agua, 15,6 ml de solución de K_2HPO_4 1 M y 6,2 ml de KH_2PO_4 .

Después, se añadió acetato de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etilo racémico
 10 (2) (250 g, 1 mol). Después la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas. El pH de la solución se mantuvo a 7,0 añadiendo NaOH 2 N. La reacción se siguió por RP - HPLC mirando tanto la conversión como % de ee del producto, y se detuvo después de que el 51 - 52% de material de partida se hubiera consumido (aproximadamente 240 ml de base añadida).

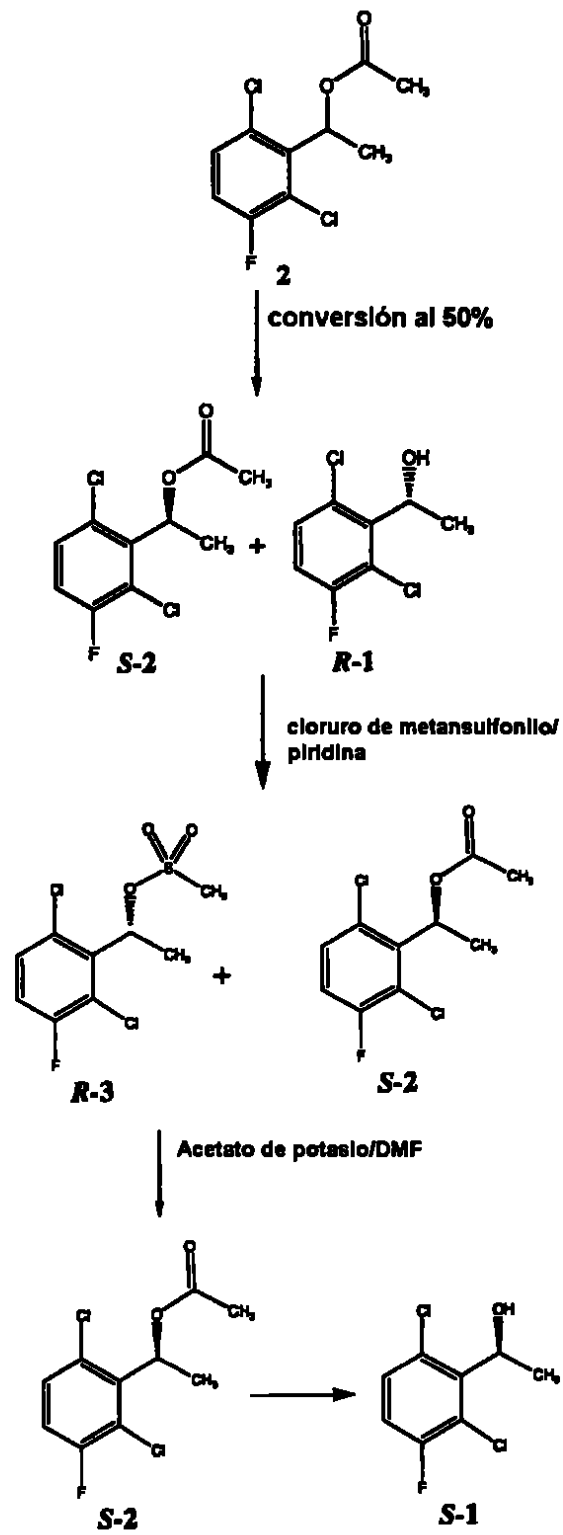
137
136

Después de la terminación de la reacción, se añadió metil terc-butil éter (MTBE) (900 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. La emulsión resultante se pasó a través de una almohadilla de filtro de celita y después se transfirió a un embudo de decantación/extractor. Esta fase incluye suspensión
5 de celita con agua desionizada y después el vertido en un embudo Buchner de la almohadilla de celita preparada. El filtrado de agua se desechó antes de pasar la emulsión enzimática. Después se separaron las fases, se extrajo la fase acuosa dos veces más con 900 ml de MTBE cada una. Las fases de MTBE combinadas se secaron con Na_2SO_4 y se concentraron a vacío
10 produciendo 242 g de mezcla de alcohol bruto y acetato.

4) Maximización de rendimiento del procedimiento de resolución enzimática desarrollando un procedimiento para la combinación de hidrólisis enzimática, esterificación e hidrólisis química con inversión

15 Una vez que se desarrolló la resolución cinética enzimática, se exploró la conversión química del alcohol "R-1" al acetato "S-2". El procedimiento se realizó según el esquema 5.

Esquema 5



138
138

A un matraz de 50 ml con camisa equipado con un electrodo de pH, un agitador en la parte superior y una línea de adición de base (1 M, NaOH), se añadió 1,2 ml de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,0 y 0,13 ml de una suspensión de PLE AS. Después el compuesto 2 (0,13 g, 0,5 mmoles, 1,00 eq) se añadió gota a gota y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h; manteniendo el pH de la reacción constante a 7,0 usando NaOH 1 M. Tanto la conversión como el ee de la reacción se controlaron mediante RP - HPLC, y se detuvo después de que se había consumido el 50% de material de partida (aproximadamente 17 horas en estas condiciones). Después la mezcla se extrajo tres veces con 10 ml de acetato de etilo recuperando tanto el éster como el alcohol en forma de una mezcla de R-1 y S-2.

Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,06 ml, 0,6 mmoles) a una solución de una mezcla de R-1 y S-2 (0,48 mmoles) en 4 ml de piridina en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas después se evaporó obteniendo un aceite. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla y después se añadió EtOAc (20 ml x 2) extrayendo la solución acuosa. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron, se filtraron, y se evaporaron produciendo una mezcla de R-3 y S-2. La mezcla se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. ^1H RMN (cloroformo-D, 400 MHz) δ ppm 1,66 (d, $J = 7,1$ Hz, 3 H), 1,84 (d, $J = 7,1$ Hz, 3 H), 2,09 (s, 3 H), 2,92 (s, 3 H), 6,39 (c, $J = 7,0$ Hz, 1 H), 6,46 (c, $J = 6,8$ Hz, 1 H), 6,98 - 7,07 (m, 1 H), 7,07 - 7,17 (m, 1 H), 7,23 - 7,30 (m, 1 H), 7,34 (dd, $J = 8,8, 4,80$ Hz, 1 H).

Se añadió acetato de potasio (0,027 g, 0,26 mmoles) a una solución de solución de una mezcla de R-3 y S-2 (0,48 mmoles) en 4 ml de DMF en

atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó hasta 100°C durante 12 horas. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla de reacción y EtOAc (20 ml x 2) extrayendo la solución acuosa. La fase orgánica combinada se secó, se filtró, y se evaporó proporcionando un aceite de S-2 (72 mg, 61% de rendimiento en dos etapas). Quiralidad ee: 97,6%. ¹H RMN (cloroformo-D, 400 MHz) δ ppm 1,66 (d, *J* = 7,1 Hz, 3 H), 2,09 (s, 3 H), 6,39 (c, *J* = 6,8 Hz, 1 H), 7,02 (t, *J* = 8,5 Hz, 1 H), 7,22 - 7,30 (m, 1 H).

Se añadió lentamente metóxido de sodio (19 mmoles, 0,5 M en metanol) al compuesto S-2 (4,64 g, 18,8 mmoles) en una atmósfera de nitrógeno a 0°C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se evaporó el disolvente y se añadió H₂O (100 ml). La mezcla de reacción enfriada se neutralizó con solución de tampón acetato sódico - ácido acético hasta un pH 7. Se añadió acetato de etilo (100 ml x 2) extrayendo la solución acuosa. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se evaporaron obteniendo S-1 en forma de un sólido blanco (4,36 g, 94,9% de rendimiento); CFS - EM: 97% de ee. ¹H RMN (cloroformo-D, 400 MHz) δ ppm 1,65 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 5,58 (c, *J* = 6,9 Hz, 1 H), 6,96 - 7,10 (m, 1 H), 7,22 - 7,36 (m, 1 H).

20 EJEMPLO 2

Bio - reducción enantioselectiva de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona

El desarrollo del procedimiento actual se acometió usando reacciones catalizadas por células enteras así como enzimas disponibles comercialmente. El procedimiento implicó la realización de tres etapas principales:

25 1) seleccionar una colección de células enteras internas (o

140

enzima aislada) que contenía principalmente cepas de levaduras y hongos (alcoholdehidrogenasas comercialmente disponibles y cetona reductasas),

- 2) realizar la optimización de reacción respecto a pH, temperatura y la cantidad de enzima y sustrato;
- 3) desarrollar un procedimiento para el reciclaje del biocatalizador.

Selección de células enteras

La selección de cepas capaces de hacer la reducción enantioselectiva de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona se llevó a cabo como sigue. Se desarrollaron cepas microbianas a partir de existencias congeladas en una placa de 96 pocillos (5 µl/pocillo). 200 µl de medio YM estéril (medios Difco 271120) se inoculó en cada pocillo. Todas las cepas se desarrollaron a 28°C y 250 rpm en un agitador rotatorio. Después de 2 días, se añadió sustrato de una solución madre al 10% en etanol para alcanzar 1mg/ml en cada pocillo. Después las placas se agitaron a la misma velocidad y temperatura y las reacciones se analizaron después de 2 - 7 días. Las reacciones se analizaron mediante HPLC usando una columna no quiral.

Ciento ochenta y ocho cepas microbianas diferentes mostradas en la tabla 3 se distribuyeron en placas de 96 pocillos y se analizaron a concentraciones de sustrato no mayores de 1 mg/ml como se ha descrito anteriormente. Treinta cepas diferentes pertenecientes a especies de *Rhodotorula*, *Neurospora*, *Rhodosporibium*, *Aerobasidium*, y *Candida* se encontraron que mostraban la actividad deseada. Todas las cepas mostraban selectividad S. Después aquellas cepas se volvieron a seleccionar y las

levaduras UC2387 pertenecientes a especies de *Rhodotorula* se eligieron para la preparación de S-1 a mayor escala.

Tabla 3			
Número de ATCC u otro	Nombre de cepa	Número de ATCC u otro	Nombre de cepa
ATCC 18101	<i>Rhodotorula</i> sp.	UC2401	<i>Rhodotorula</i> sp.
ATCC 18818	<i>Rhodotorula diffluens</i>	UC2395	<i>Candida</i> sp.
ATCC 14023	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UC2466	<i>Rhodospiridium dibovstum</i>
ATCC 18813	<i>Rhodotorula buffonii</i>	UC2461	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 20804	<i>Rhodotorula graminis</i>	UC2454	<i>Rhodotorula glutinis</i>
ATCC 10656	<i>Cryptococcus flavus</i>	UC2447	<i>Rhodotorula</i> sp.
ATCC 24010	<i>Rhodotorula javanica</i>	UC2431	<i>Sporobolomyces</i> sp.
ATCC 28954	<i>Rhodotorula bacarum</i>	UC17612	Unknown yeast
ATCC 28322	<i>Rhodotorula sonckii</i>	UC17613	Unknown yeast
ATCC 20837	<i>Rhodotorula</i> sp.	UC2472	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 20254	<i>Rhodotorula</i> sp.	UC2471	<i>Rhodotorula minuta</i>
ATCC 28135	<i>Rhodotorula hordeae</i>	UC2468	<i>Rhodotorula graminis</i>
ATCC 22078	<i>Rhodotorula araucanae</i>	UC17483	Unknown yeast
ATCC 10659	<i>Rhodotorula glutinis</i>	UC16748	Unknown yeast
ATCC 58914	<i>Rhodotorula futronensis</i>	UC16508	Unknown yeast
ATCC 52903	<i>Rhodotorula phylloplana</i>	UC4229	<i>Rhodospordium sphacrocarpum</i>
ATCC 52902	<i>Rhodotorula hinuulae</i>	UC4235	<i>Rhodospordium sphacrocarpum</i>
ATCC 52907	<i>Rhodotorula armeniacae</i>	UC4246	<i>Hansenula anomala</i>
ATCC 42713	<i>Rhodotorula acuta</i>	UC4254	<i>Candida norvegensis</i>

Tabla 3

Número de ATCC u otro	Nombre de cepa	Número de ATCC u otro	Nombre de cepa
ATCC 32034	<i>Rhodotorula pustula</i>	UC4265	<i>Candida zeylanoides</i>
ATCC 10858	<i>Rhodotorula minuta</i>	UC4281	<i>Cryptococcus albidus</i>
ATCC 42552	<i>Rhodotorula matritensis</i>	UC4247	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
ATCC 28983	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC4255	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 76737	<i>Rhodotorula ferulica</i>	UC4266	<i>Candida rugosa</i>
ATCC 90775	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	UC4282	<i>Debaryomyces hansenii</i>
ATCC 10855	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	UC4248	<i>Candida parapsilosis</i>
ATCC 52823	<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	UC4268	<i>Debaryomyces hansenii</i>
ATCC 90391	<i>Rhodotorula lactosa</i>	UC4238	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATCC 32764	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	UC4272	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC 32768	<i>Rhodotorula graminis</i>	UC4288	<i>Trichosporon cutaneum</i>
ATCC 52902	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	UC4242	<i>Cryptococcus laurentii</i>
ATCC 13548	<i>Cryptococcus laurentii</i>	UC4260	<i>Candida tenuis</i>
ATCC 16727	<i>Rhodotorula graminis</i>	UC4269	<i>Candida sp.</i>
ATCC 18176	<i>Rhodotorula lactosa</i>	UC4275	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 16182	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	UC4289	<i>Candida raghii</i>
ATCC 886	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC4244	<i>Rhodospiridium sphacrocarpum</i>
ATCC 22946	<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	UC4253	<i>Candida polymorpha</i>
ATCC 22993	<i>Rhodotorula ingensosa</i>	UC4263	<i>Rhodotorula pilimanae</i>
ATCC 22875	<i>Rhodotorula hylophila</i>	UC4277	<i>Rhodotorula glutinis</i>
ATCC 18809	<i>Rhodotorula bogonensis</i>	UC4284	<i>Candida norvegensis</i>
ATCC 34888	<i>Rhodotorula muscorum</i>	UC 1787	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 44533	<i>Rhodotorula pilati</i>	UC2387	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 24121	<i>Rhodotorula auriculariae</i>	UC1827	<i>Bullera sp.</i>
ATCC 18820	<i>Rhodotorula foliorum</i>	UC1846	<i>Geotrichum sp.</i>
ATCC 28485	<i>Pichia pastoris</i>	UC1281	<i>Candida sp.</i>
ATCC 17697	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	UC1763	<i>Bullera sp.</i>
ATCC 999	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	UC1765	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 35411	<i>Lactobacillus kefir</i>	UC1247	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 27337	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	UC1258	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 26012	<i>Hansenula polymorpha</i>	UC1284	<i>Candida sp.</i>
ATCC 17798	<i>Chlostridium ps.</i>	UC1268	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 25619	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	UC1276	<i>Rhodotorula sp.</i>

143

Tabla 3			
Número de ATCC u otro	Nombre de cepa	Número de ATCC u otro	Nombre de cepa
ATCC 23973	<i>Pseudomonas putida</i>	UC1202	<i>Rhodospordium sp</i>
ATCC 12276	<i>Aspergillus niger</i>	UC1209	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 10436	<i>Penicillium decumbens</i>	UC1213	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 66816	<i>Thurialespora sp.</i>	UC1235	<i>Candida sp.</i>
ATCC7159	<i>Beauveria sulfurea</i>	UC1240	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 21768	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	UC1184	<i>Candida sp.</i>
ATCC 33305	<i>Acinetobacter sp</i>	UC1779	<i>Aerobasidium sp.</i>
ATCC 1207a	<i>Mucor circinelloides</i>	UC1185	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 22792	<i>Dipodascus uninucleatus</i>	UC1190	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC 12975	<i>Rhodococcus fascians</i>	UC1192	<i>Rhodosporidium sp</i>
ATCC 7924	<i>Mucor racemosus</i>	UC1195	<i>Candida sp.</i>
ATCC 11048	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	UC5113	<i>Aerobasidium mansonii</i>
ATCC 9692	<i>Mucor ramannianus</i>	UC5098	<i>Cryptococcus laurentii var laurentii</i>
ATCC 29670	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	UC5084	<i>Cryptococcus laurentii var laurentii</i>
NRRL Y-164	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	UC4317	<i>Candida tenuis</i>
ATCC 10613	<i>S. uvarum</i>	UC4310	<i>Rhodotorula sp.</i>
ATCC35047	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	UC5110	<i>Candida guilliermondii</i>
ATCC 10788	<i>Rhodotorula toruloides</i>	UC5093	<i>Cryptococcus laurentii var laurentii</i>
ATCC 35091	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	UC4327	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 8527	<i>Clostridium kluyveri-anaerobic</i>	UC4316	<i>Candida curvata</i>
ATCC 14692	<i>Neurospora crassa</i>	UC4309	<i>Rhodotorula rubra</i>
ATCC 18817	<i>Yarrowia lipolytica</i>	UC5103	<i>Candida sp.</i>
ATCC 21864	<i>Rhodococcus sp.</i>	UC5089	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
ATCC 38191	<i>Mortierella ramanniana</i>	UC4324	<i>Cryptococcus sp.</i>
ATCC 10640	<i>Kloeckera cortici</i>	UC4315	<i>Candida sp.</i>
ATCC 10679	<i>T. variabilis</i>	UC4305	<i>Candida tenuis</i>
ATCC 39213	<i>Pseudomonas putida</i>	UC5101	<i>Matschinkowia buccispinata</i>
ATCC 49097	<i>Bacillus simplex</i>	UC5088	<i>Hansenula anomala</i>
UC 2390	<i>Rhodotorula Sp.</i>	UC4321	<i>Cryptococcus albidus var albidus</i>
UC2387	<i>Rhodotorula Sp.</i>	UC4313	<i>candida lipolytica</i>
UC2386	<i>Rhodotorula minuta</i>	UC4304	<i>Candida tropicalis</i>
UC2385	<i>Cryptococcus sp.</i>	UC5100	<i>Candida norvegensis</i>
UC2371	<i>Candida sp.</i>	UC5087	<i>Candida krusei</i>
UC2419	<i>Candida sp</i>	UC4319	<i>Torulopsis candida</i>
UC2411	<i>Rhodotorula sp.</i>	UC4312	<i>Trichosporum cutaneum</i>

246
148

1/50 - 1/100) y el cultivo resultante se desarrolló durante 1 día antes de que se añadiera sustrato de una solución de etanol al 10%. Se usó medio YM (medio Difco 271120) para ambos cultivos de líquido así como placas a base de agar. Para la reducción de 2 g (9,6 mmoles) de 1-(2,6-dicloro-3- fluorofenil)etanona, era necesario 1 l de preparación. El cultivo de la primera etapa que contenía 10 ml de YM y el cultivo entero se usaron para inocular el cultivo de la segunda fase (1 l). Después del desarrollo durante 3 días, se añadió sustrato puro y se agitó la reacción durante 7 días. Tanto la conversión de 1-(2,6-dicloro-3- fluorofenil)etanona al isómero deseado del alcohol S-1 como el ee de S-1 se controlaron mediante RP - HPLC. La reacción se detuvo después de que se alcanzara 57% de conversión cuando las células de levaduras se separaron mediante centrifugación a 5.000 rpm. El material de partida restante y el producto deseado se recuperaron mediante extracción (tres veces con 0,5 volúmenes de acetato de etilo).

15

Estudios sobre las cargas máximas de sustrato y reciclado de células de levaduras

Se analizó concentración de sustrato en el intervalo de 1 - 20 g/l, y se eligió 2,5 g/l debido a que permitía el mejor rendimiento espacio - tiempo (aproximadamente 0,5 g/l/d) correspondiente a una velocidad de formación de producto de 0,1 g por gramo de microorganismo al día. Los rendimientos de producto aislado están en el intervalo entre 50 y 100%. La escasa solubilidad del precursor en agua < 2,5 g/l evita el uso de cargas de sustrato mayores. Resinas no iónicas XAD (producidas por Rohm y Hass) conocidas por absorbern compuestos orgánicos (según una publicación de D'Arrigo, y col.,

25

147
140

Tetrahedron: Asymmetry, 1997, vol. 8, pp. 2375 - 2379) se podrían usar para el atrapamiento del sustrato o producto (principalmente proporcionando una lenta liberación de sustrato y evitar la toxicidad de sustrato a las células o la inhibición de enzimas). Esta técnica permite el uso de cargas de sustrato de 20 g/l o mayores.

Células inmovilizadas en alginato de calcio según el procedimiento de Rotthaus, y col., *Tetrahedron*, 2002, vol. 58, pp. 7291 - 93, demostraron que era una solución práctica para el reciclado y mejor uso del catalizador. Las células de levaduras atrapadas eran más resistentes a la tensión mecánica y al mismo tiempo, se observó mejoras significativas en la recuperación de productos. También se observaron cargas de sustrato similares a las observadas con células enteras.

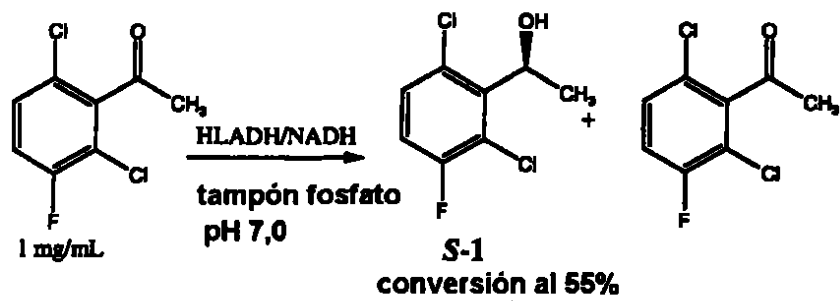
Selección de enzimas comercialmente disponibles

La selección de enzimas capaces de realizar la reducción enantioselectiva de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona se llevó a cabo como sigue. Se analizaron 27 cetona reductasas diferentes (compradas a Biocatalytics, Inc como un kit KRED - M27), así como 4 alcohol deshidrogenasas (alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH), alcohol deshidrogenasa de levadura, alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium brokii* y alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*) disponible de Sigma Aldrich. Las reacciones enzimáticas Kred se realizaron a 1 mg/ml de carga de sustrato y usando NADPH como agente reductor. Las alcohol deshidrogenasas se analizaron usando tanto NADH como NADPH. Solamente la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) catalizaba la reducción selectiva de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona proporcionando

148
147

(S)-1 según el esquema 7.

Esquema 7



5 HLADH se ha reseñado previamente para la reducción de sustratos múltiples (actúa como una ADH tipo E3 según Nakamura, y col., *Tetrahedron asymmetry*, 2003, vol. 14, pp. 2659 - 2681) siguiendo la regla de prelog (Prelog, V, *Pure App. Chem.*, 1964, vol. 9, 119).

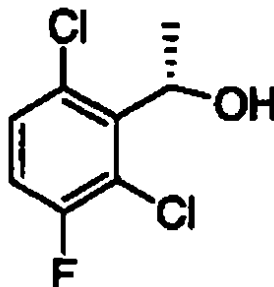
La tabla 4 contiene las relaciones sustrato a enzima (S:E) evaluadas.

10

Tabla 4

Relación	Conversión (%)		
S:E	NADPH	NAD	Tiempo Rx (h)
1:1	6	15	18
1:2	13	25	18
1:5	20	41	18
1:10	42	55	64

Compuesto S-1

148
149**(1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol**

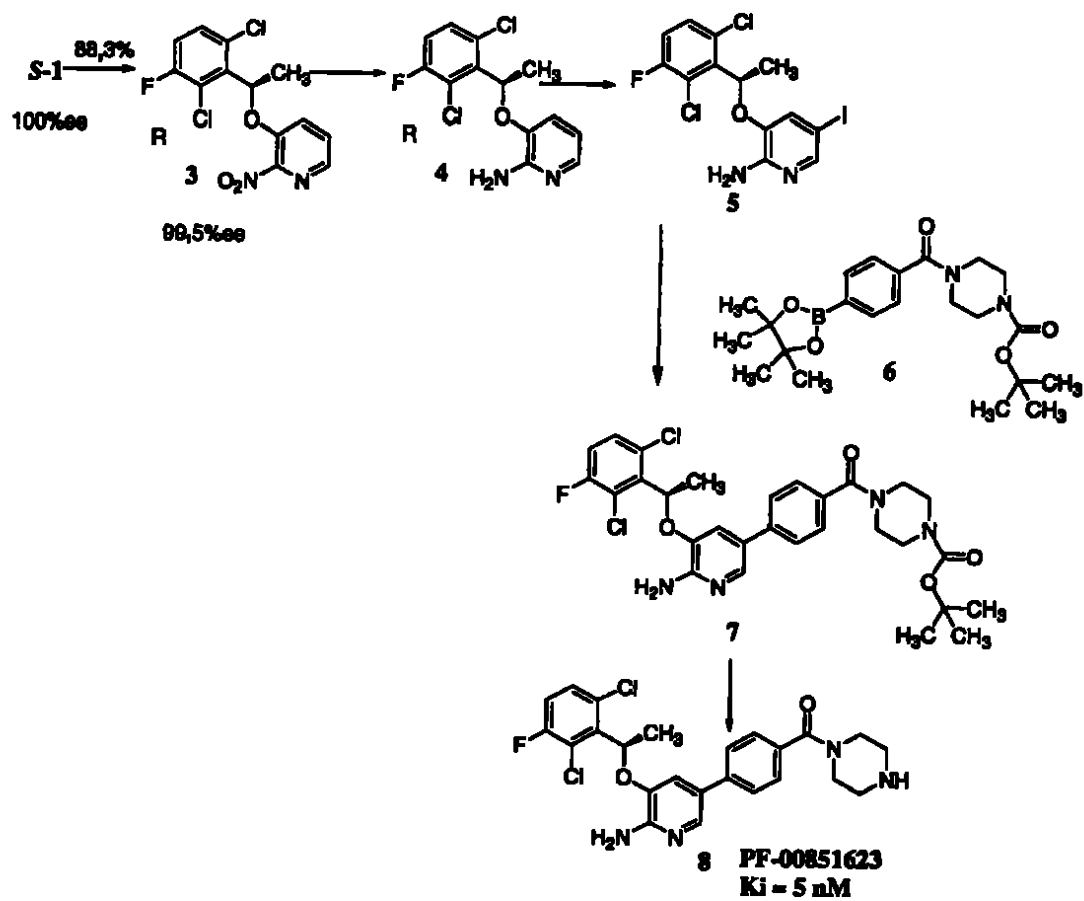
- 5 El compuesto **S-1** se purificó a partir de la cetona del material de partida mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 15 → 20% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto **S-1** en forma de un aceite incoloro (229,8 mg, 1,1 mmoles); CFS - EM: 100% de ee. ^1H RMN (MeOD, 400 MHz) δ ppm 1,58 (d, $J = 7,1$ Hz, 3 H), 5,61 (c, $J = 6,8$ Hz, 1 H), 7,14 (t, $J = 8,6$ Hz, 1 H),
10 7,35 (dd, $J = 9,0, 4,9$ Hz, 1 H).

EJEMPLO 3.

- Uso de (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol en la síntesis de inhibidores de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento de
15 hepatocitos humanos

Se usó (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol como un intermedio en la síntesis quiral de inhibidores de tirosina quinasa del receptorg del factor de crecimiento de hepatocitos humanos según el esquema 8 y procedimientos de síntesis descritos más adelante.

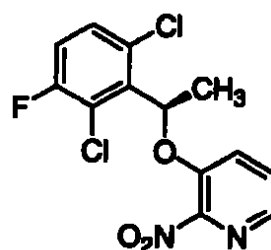
- 20 Esquema 8



Compuesto 3

3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-2-nitropiridina

5



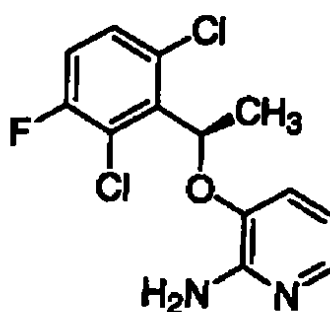
131
150

Se añadieron 3-hidroxi-2-nitropiridina (175 mg, 1,21 mmoles), trifenilfosfina (440 mg, 1,65 mmoles) secuencialmente a una solución agitada de **S-1** (229,8 mg, 1,1 mmoles) en THF (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y después se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (0,34 ml, 1,65 mmoles) a 0°C. La mezcla se agitó durante 12 horas adicionales. La mezcla de reacción se evaporó a vacío proporcionando un aceite. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 20 → 25% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto **3** en forma de un sólido blanco (321,5 mg, 0,97 mmoles; 88,3% de rendimiento); EM (IQPA) (M + H)⁺ 331; CFS - EM: 99,5% de ee. ¹H RMN (CLOROFORMO-D, 400 MHz) δ ppm 1,85 (d, J = 6,6 Hz, 3 H), 6,10 (c, J = 6,6 Hz, 1 H), 7,04 - 7,13 (m, 1H), 7,21 (dd, J = 8,5, 1,14 Hz, 1 H), 7,30 (dd, J = 9,0, 4,9 Hz, 1 H), 7,37 (dd, J = 8,6, 4,6 Hz, 1 H), 8,04 (dd, J = 4,6, 1,3 Hz, 1 H).

15

Compuesto 4

3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]piridin-2-amina



20

Se añadió hierro (365 mg) a una solución agitada del compuesto **3** (321

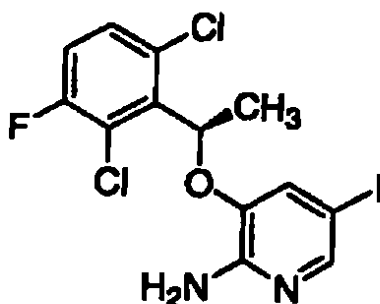
152
15

mg, 0,97 mmoles) en una mezcla de EtOH (2 ml) y HCl 2 M (0,2 ml) a 0°C. La solución resultante se calentó a 85°C durante 2 horas. Se añadió celita (0,5 g) a la mezcla de reacción enfriada. Esta mezcla se filtró sobre un lecho de celita y se evaporó proporcionando el compuesto 4 en forma de un aceite oscuro. EM (IQPA) (M + H)⁺ 301. El compuesto 4 se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación posterior.

Compuesto 5

3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-yodopiridin-2-amina

10



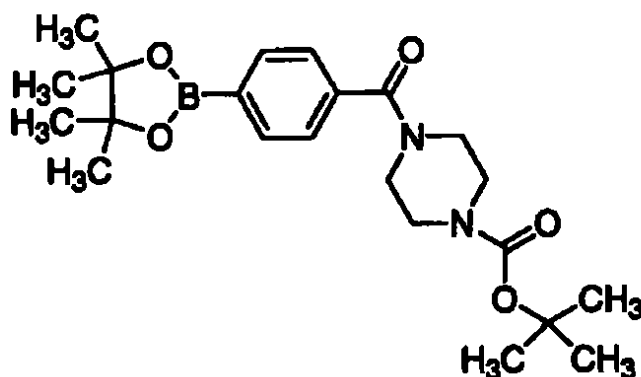
Se añadieron ácido peryódico (60 mg, 0,24 mmoles), yodo (130 mg, 0,5 mmoles), y ácido sulfúrico (0,03 ml) secuencialmente a una solución agitada del compuesto 4 (0,97 mmoles) en una mezcla de ácido acético (3 ml) y H₂O (0,5 ml). La solución resultante se calentó hasta 80°C durante 5 horas. La mezcla de reacción enfriada se inactivó con Na₂SO₃ (80 mg) y se basificó con Na₂CO₃ sat (2 x 100 ml) hasta pH 7. Se añadió CH₂Cl₂ (2 x 50 ml) extrayendo la solución acuosa. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄, después se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 35 → 40% de EtOAc en hexanos)

proporcionando el compuesto 5 en forma de un aceite amarillo (254 mg, 0,6 mmoles; 61,6% de rendimiento); EM (IQPA) (M + H)⁺ 426; ¹H RMN (Cloroformo-D, 400 MHz) δ ppm 1,81 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 4,86 (s, 2H), 5,98 (c, J = 6,57 Hz, 1 H), 6,96 (d, J = 1,5 Hz, 1 H), 7,08 (dd, J = 9,0, 8,0 Hz, 1 H), 7,31 (dd, J = 8,8, 4,8 Hz, 1 H), 7,78 (d, J = 1,8 Hz, 1 H).

Compuesto 6

4-[4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoil]piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo

10



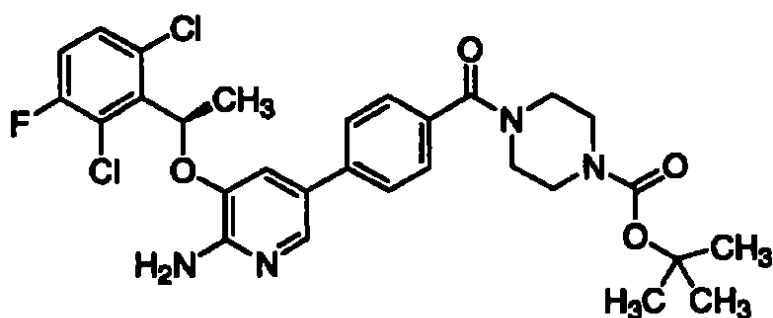
Se añadió 1,1'-carbonyldiimidazol (360 mg, 2,2 mmoles) a una solución de ácido 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoico (515 mg, 2 mmoles) en CH₂Cl₂ (50 ml) en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se añadió 1-piperazinacarboxilato de *terc*-butilo (390 mg, 2 mmoles). La suspensión resultante se agitó durante 12 horas en atmósfera inerte. La mezcla se vertió en H₂O (50 ml) para agitar y se añadió CH₂Cl₂ (2 x 50 ml) extrayendo la solución acuosa. Se secaron las fases orgánicas combinadas, se filtraron y se

134
B

concentraron proporcionando un residuo de aceite incoloro. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 20. → 25% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto 6 en forma de un sólido blanco (461 mg, 1,1 mmoles; 55,4% de rendimiento); EM (IQPA) (M + H)⁺ 417; ¹H RMN (Cloroformo-D, 400 MHz) δ ppm 1,34 (s, 12 H), 1,45 (s, 9 H), 3,26 - 3,42 (m, 4 H), 3,44 - 3,56 (m, 2 H), 3,66 - 3,89 (m, 2 H), 7,37 (d, J = 8,1 Hz, 2 H), 7,84 (d, J = 8,1 Hz, 2 H).

Compuesto 7

10 4-(4-{6-amino-5-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]piridin-3-il}benzoil)piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo



Se añadió el compuesto 6 (300 mg, 0,72 mmoles) a una solución del
15 compuesto 5 (254 mg, 0,6 mmoles) en 7 ml de DME (etilen glicoldimetil éter).
La mezcla se purgó con nitrógeno varias veces y después se añadió
diclorobis(trifenilfosfino) paladio (II) (50 mg, 0,06 mmoles). Se añadió carbonato
de sodio (200 mg, 1,8 mmoles) en 1,5 ml de H₂O a la mezcla de reacción y la
solución resultante se calentó hasta 85°C durante 12 horas. Se añadió agua
20 (50 ml) a la mezcla de reacción inactivando la reacción. Después se añadió

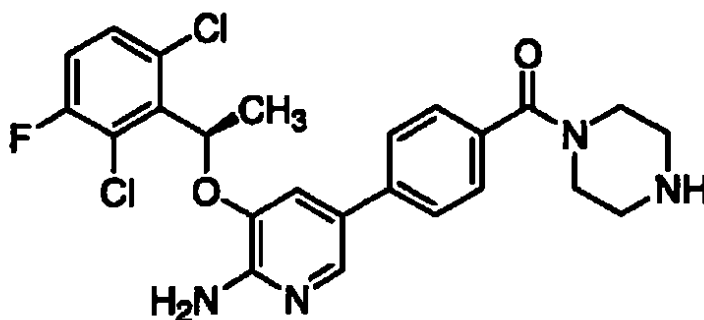
155
154

EtOAc (2 x 50 ml) extrayendo la solución acuosa. La fase combinada de EtOAc se secó, se filtró, y se evaporó proporcionando un residuo oleoso amarillo marrón. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluyendo con 75 → 80% de EtOAc en hexanos) proporcionando el compuesto 7 en forma de un sólido blanco (255,5 mg, 0,43 mmoles; 72,9% de rendimiento); EM (IQPA) (M + H)⁺ 589; ¹H RMN (Cloroformo-D, 400 MHz) δ ppm 1,45 (s, 9 H), 1,85 (d, J = 6,6 Hz, 3 H), 4,92 (s, 2 H), 6,10 (c, J = 6,8 Hz, 1 H), 6,97 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 7,01 - 7,10 (m, 1 H), 7,29 (dd, J = 9,0, 4,9 Hz, 1 H), 7,36 - 7,42 (m, 3 H), 7,58 - 7,64 (m, 1 H), 7,87 (d, J = 1,5 Hz, 1 H).

10

Compuesto 8

3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-[4-(piperazin-1-ilcarbonyl)fenil]piridin-2-amina



15

Se añadió ácido clorhídrico (1,3 ml, 4,8 mmoles) a una solución del compuesto 7 en etanol (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y después se evaporó a vacío proporcionando un aceite. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra - rápida (eluyendo con 25 → 40% de CH₃OH en EtOAc) proporcionando el compuesto 8 en forma de un

20

153-156

sólido blanco (180,4 mg, 0,37 mmoles; 85,2% de rendimiento); EM (IQPA) (M + H)⁺ 489; CFS - EM: 100% de ee. ¹H RMN (MeOD, 400 MHz) δ ppm 1,88 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 2,92 - 3,21 (m, 4 H), 3,58 - 4,07 (m, 4 H), 6,21 (c, J = 6,8 Hz, 1 H), 7,02 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 7,18 - 7,27 (m, 1 H), 7,41 - 7,45 (m, 1 H), 7,46 (s, 4 H), 7,78 (d, J = 1,8 Hz, 1 H). Anal. Calculado para C₂₄H₂₃Cl₂FN₄O₂ • 2HCl • 1,25 H₂O C: 49,29, H: 4,74, N: 9,58. Encontrado C: 49,53, H: 4,82, N: 9,29.

Aunque la invención se ha ilustrado como referencia a realizaciones específicas y preferidas los expertos en la técnica reconocerán que se pueden realizar variaciones y modificaciones mediante experimentación rutinaria y práctica de la invención. De este modo, la invención se propone que está limitada por la descripción anterior, sino que se defina por las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

La descripción entera de patentes y solicitudes de patentes y publicaciones de no patentes citadas en la presente memoria descriptiva se incorpora como referencia.

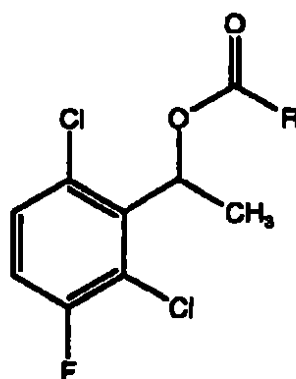
137
156

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que está al menos 95% libre de
5 (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

2. Un procedimiento de separación de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos enantioméricos de fórmula (I):



10 en la que R es hidrógeno, alquilo C₁ - C₂₀, cicloalquilo C₃ - C₈, arilo C₆ - C₁₄, arilalquilo C₇ - C₁₅, alcoxi C₁ - C₂₀, alquil C₁ - C₂₀ amino, en la que dichos radicales hidrocarburo pueden estar opcionalmente monosustituídos o polisustituídos con hidroxilo, formilo, oxi, alcoxi C₁ - C₆, carboxi, mercapto, sulfo, amino, alquil C₁ - C₆ amino, nitro o halógeno,

15 comprendiendo el procedimiento las etapas de:

poner en contacto los ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos de fórmula (I) con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos en la que

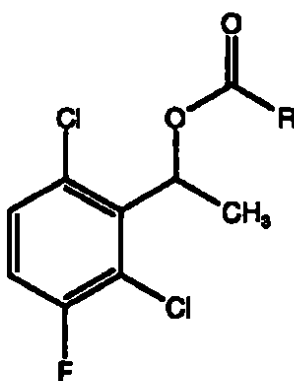
13/0
15/1

solamente un enantiómero se hidroliza selectivamente para proporcionar un isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y un isómero ópticamente activo sin reaccionar de éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos, y

- 5 separar el isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol del éster 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico ópticamente activo sin reaccionar.

3. Un procedimiento para preparar (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol que comprende las etapas de:

- 10 poner en contacto una mezcla de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos enantioméricos de fórmula (I):



- en la que R es hidrógeno, alquilo C₁ - C₂₀, cicloalquilo C₃ - C₈, arilo C₆ - C₁₄, arilalquilo C₇ - C₁₅, alcoxi C₁ - C₂₀, alquil C₁ - C₂₀ amino, en la que dichos
15 radicales hidrocarburo pueden estar opcionalmente monosustituidos o polisustituidos con hidroxilo, formilo, oxi, alcoxi C₁ - C₆, carboxi, mercapto, sulfo, amino, alquil C₁ - C₆ amino, nitro o halógeno,

con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos en la que solamente el

189
2

enantiómero (R)- se hidroliza selectivamente para proporcionar una mezcla de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y un éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico;

convertir la mezcla de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster
5 (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico en (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol; y

recuperar (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de conversión
10 comprende:

a) hacer reaccionar (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol en la mezcla de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico con un haluro de sulfonilo orgánico en un disolvente aprótico para formar una mezcla de un éster de ácido sulfónico orgánico
15 de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico;

b) adicionalmente hacer reaccionar el éster de ácido sulfónico orgánico de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol en la mezcla del éster de ácido sulfónico orgánico de (1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico con una sal de metal alcalino de un ácido carboxílico alifático en un disolvente aprótico para formar una mezcla de un éster de ácido carboxílico alifático de (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico; y
20

25 c) transformar la mezcla del éster del ácido carboxílico alifático de (1S)-1-

(2,6- dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico en (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa de transformación c) comprende

5 someter a solvolisis la mezcla del éster del ácido carboxílico alifático de (1S)-1-(2,6- dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico en un disolvente alcohólico o acuoso en presencia de una sustancia básica para formar (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que en la etapa de
10 transformación c) la mezcla del éster del ácido carboxílico alifático de (1S)-1-(2,6- dicloro-3-fluorofenil)etanol y el éster (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólico se somete a solvolisis en metanol en presencia de metóxido de sodio para formar (1S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que:

15 R es metilo;

en la etapa de reacción a) el haluro de sulfonilo orgánico es cloruro de metanosulfonilo, el disolvente aprótico es piridina;

en la etapa de reacción b) la sal de metal alcalino de los ácidos carboxílicos alifáticos es acetato de potasio y el disolvente aprótico es
20 dimetilformamida.

8. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el biocatalizador es una enzima seleccionada entre el grupo constituido por Amano D (lipasa de

1/61
160

R. delemar), Amano AY (lipasa de *C. rugosa*), Amano F (lipasa de *R. oryzae*) y esterasa de hígado de cerdo.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que la enzima se usa en una cantidad de 0,1 a 100 partes en peso basándose en 100 partes en peso de la mezcla de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos enantioméricos.

10. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de poner en contacto la mezcla de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos enantioméricos con el biocatalizador se lleva a cabo en una solución acuosa entre 0 y 60°C con mantenimiento de pH a de 4 a 12.

10 11. Un procedimiento para preparar un isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol comprende la etapa de reducir la 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanona mediante un biocatalizador de una manera enantioselectiva en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos para proporcionar dicho isómero
15 ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, que comprende además la etapa de recuperar dicho isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el
20 que dicho isómero ópticamente activo de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol es (S)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol.

14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el

161
182

que el biocatalizador es una enzima.

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la enzima es alcoholdehidrogenasa de hígado de caballo.

Resumen

La invención se refiere a procedimientos biocatalíticos para preparar estereoisómeros enantioméricamente puros de 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanol. Se describen procedimientos de preparación del
5 enantiómero (S) deseado, dichos procedimientos basándose en una combinación de resolución enzimática, esterificación química e hidrólisis química con inversión de ésteres 1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etanólicos o bio - reducción estereoselectiva de 2,6-dicloro-3-fluoroacetofenona con un biocatalizador tal como una enzima o microorganismo. El enantiómero (S)
10 quiral se puede usar en la síntesis de ciertos compuestos 2-aminopiridina unidos a éter enantioméricamente enriquecidos, que inhiben potentemente la autofosforilación de receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humanos.

164
163

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL DE PATENTABILIDAD
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
Estados Unidos de América

Sello de Recibido 09 de agosto de 2006, Departamento de patentes
FIZER INC.

Fecha de expedición: 04.08.2006
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32262A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/002839
Fecha de presentación internacional: 15.08.2005
Fecha de prioridad: 26.08.2004
Solicitante: PFIZER INC et al

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39 (1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de

informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea Gitschiner Str. 103
D-10958 Berlín
Tel: +49-30 25901- 0
Fax: +49 30 25901 - 840

Funcionario Autorizado: HALBARTSCHLAGER, M
Tel: + 49 30 25901 - 714

246
161

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32262A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/002839
Fecha de presentación internacional: 15.08.2005
Fecha de prioridad: 26.08.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: INV. C12P 7/22 CO7C 33/46 C12P 41/00
Solicitante: PFIZER INC et al

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 6 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
 - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de hojas, descritas a continuación:
 - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
 - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
 - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☐ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☐ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☐ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 17.10.2005

Fecha de elaboración de este reporte: 04.08.2006

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea – Gitschiner Str. 103

D- 10958 Berlin

Tel: +49-30 25901 – 0

Fax: +49-30 25901 – 840

Funcionario Autorizado: Ceder, O

Tel: + 49 30 25901-

167
166

162-168

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 46 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

168/89

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida"

Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35 (2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 1-15
	No:	Reivindicaciones
Nivel Inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones 1-15
	No:	Reivindicaciones
Aplicación Industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones 1-15
	No:	Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

SECCIÓN V

Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones soportando dicha declaración

1 Documentos

1.1 Se hace referencia a los siguientes documentos:

- 1 2 D1: YAZBECK ET AL., ADV. SYNTH. CATAL., vol. 345, 2003, páginas 524- 532
D2: LIU ET AL., CHIRALITY, vol. 14, 2002, páginas 25- 27
D3: VÄNTTINEN ET AL., TETRAHED.: ASYM., vol. 6, 1995, páginas 1779- 1786
D4: US5457052
D5: WO02077258
D6: ITOH ET AL., EUROP. J. BIOCHEM., vol. 269, 2002, páginas 2394- 2402

2 Novedad (Artículo 33(2) del PCT)

2.1 La presente solicitud si satisface los criterios establecidos en el Artículo 33(2) del PCT puesto que la **materia de las reivindicaciones 1- 15 es novedosa** con respecto a los antecedentes citados según se define en los reglamentos (Regla 64(1)- (3) del PCT).

3 Nivel Inventivo (Artículo 33(3) del PCT)

3 1 La presente solicitud si satisface los criterios establecidos en el Artículo 33(3) del PCT puesto que la **materia de las reivindicaciones 1- 15 posee nivel inventivo** (Regla 65(1)(2) del PCT).

3.2 La reivindicación 1 se relaciona con (1S)- 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol que esté por lo menos un 95% libre de (1R)- 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol. Las reivindicaciones 2 y 3 se relacionan con métodos para producir el anterior compuesto (1S) al hacer que un éster de 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol haga contacto con un biocatalizador e hidrolize de manera enantioselectiva el éster. La reivindicación 11 se relaciona con un método para producir el anterior compuesto (1S) al hacer que una 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanona haga contacto con un biocatalizador y reduzca de manera enantioselectiva la cetona.

3.3 Los antecedentes citados (D1- D6) no divulgan un (1S)- 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol que esté por lo menos un 95% libre del enantiómero (1R). El estado de la técnica no divulga adicionalmente ningún método para producir de manera específica tal enantiómero (1S). El estado de la técnica generalmente divulga métodos enzimáticos/químicos (combinados) para la producción específica de enantiómeros de

alcoholes secundarios a partir de los ésteres correspondientes (D1- D4) y/o cetonas (D1, D5 y D6). Sin embargo, el estado de la técnica no divulga cómo aquella persona experta en el estado de la técnica, con una razonable posibilidad de éxito, sabría cómo producir el enantiómero (1S) específico de la presente solicitud. Por lo tanto, se considera que aquella persona experta tendría que aplicar habilidades inventivas para llegar a la materia de la solicitud. Por lo tanto, se reconoce el nivel inventivo de las reivindicaciones 1- 15.

171
170

4. Comentarios adicionales

4.1 Las reivindicaciones 2 y 3 se relacionan con el uso de un biocatalizador para producir (1S)- 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol. Esto debe considerarse como un mero desiderátum puesto que aquella persona experta no sabría cuál biocatalizador utilizar. Es bastante claro a partir del conocimiento general en el estado de la técnica que no cualquier biocatalizador funcionaría, sino que solo algunos específicos serían útiles. Esto se resalta adicionalmente por las Tablas 1 y 2 de la solicitud las cuales demuestran que solo un número limitado de enzimas probadas son útiles en el método (ver en particular la Tabla 2) Las reivindicaciones deben redactarse nuevamente para revelar esto.

4.2 La reivindicación 11 se relaciona con el uso de un biocatalizador para producir (1S)- 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol a partir de 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanona. Sin embargo, es claro a partir de la descripción (página 41, líneas 27- 29) que solo el "alcohol deshidrogenasa de hígado equino (HLADH, por su sigla en inglés) catalizó la reducción selectiva de 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanona a (1S)- 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol. La reivindicación debe redactarse nuevamente para reflejar esto

4.3 Las reivindicaciones 3 y 11 generalmente se refieren con la producción de un isómero ópticamente activo de 1- (2,6- dicloro- 3- fluorofenil)etanol. Sin embargo, la descripción y ejemplos de la solicitud solo sustentan la producción del enantiómero (1S). Las reivindicaciones deben redactarse nuevamente para reflejar esto.

4.4 La indicación gráfica de las formas (1R) y (1S) del grupo -OH ópticamente activo en las fórmulas, por lo menos en las páginas 30, 32 y 42, parece ser inconsistente y debería ser verificado y modificado según sea necesario.

4.5 De acuerdo con los requisitos establecidos por la Regla 5.1(a)(ii) del PCT, D4- D5 deberían ser identificados en la descripción y su materia relevante brevemente discutida

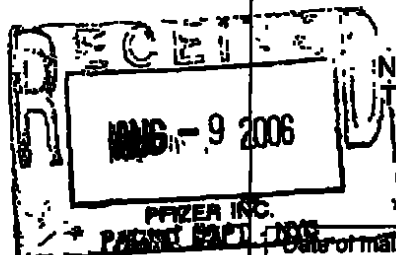
PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
ETATS-UNIS D'AMERIQUE



NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

04.08.2006

Applicant's or agent's file reference
PC32262A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No
PCT/AB2005/002839

International filing date (day/month/year)
15.08.2005

Priority date (day/month/year)
26.08.2004

Applicant
PFIZER INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability 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/AB/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 report on patentability. 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.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority.



European Patent Office - Giltchiner Str. 103
D-10958 Berlin
Tel. +49 30 25901 - 0
Fax +49 30 25901 - 840

Authorized Officer

HALBARTSCHLAGER, M

Tel. +49 30 25901-714



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

12
13

Applicant's or agent's file reference PC32262A		FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA416
International application No PCT/IB2005/002839	International filing date (day/month/year) 15.08.2005	Priority date (day/month/year) 26.08.2004	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12P7/22 C07C33/46 C12P41/00			
Applicant PFIZER INC. et al.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions) ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4 This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 17.10.2005		Date of completion of this report 04.08.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority  European Patent Office - Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840		Authorized officer Ceder, O Telephone No. +49 30 25901-	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No. **124**
PCT/IB2005/002839

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-46 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70 2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No. **PCT/IB2005/002839**

174.
X75

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

.....

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

1. Documents

1.1 Reference is made to the following documents:

- 1.2 D1: YAZBECK ET AL., ADV. SYNTH. CATAL., vol. 345, 2003, pages 524-532**
D2: LIU ET AL., CHIRALITY, vol. 14, 2002, pages 25-27
D3: VÄNTTINEN ET AL., TETRAHED.: ASYM., vol. 6, 1995, pages 1779-1786
D4: US5457052
D5: WO02077258
D6: ITOH ET AL., EUROP. J. BIOCHEM., .vol. 269, .2002, pages 2394-2402

2. Novelty (Art. 33(2) PCT)

- 2.1 The present application does satisfy the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1-15 is new in respect of the cited prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).**

3. Inventive step (Art. 33(3) PCT)

- 3.1 The present application does satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT, because the subject-matter of claims 1-15 does involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).**
- 3.2 Claim 1 is concerned with (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol that is at least 95% free of (1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. Claims 2 and 3 are concerned with methods to produce the above (1S) compound by contacting an 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol ester with a biocatalyst and enantioselectively**

hydrolyse the ester. Claim 11 is concerned with a method to produce the above (1S) compound by contacting 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone with a biocatalyst and enantioselectively reduce the ketone.

- 3.3 The cited prior art (D1-D6) does not disclose an (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol that is at least 95% free of the (1R) enantiomer. The art does further not disclose any methods to specifically produce such an (1S) enantiomer. The art generally disclose (combined) enzymatic/chemical methods for enantiomer specific production of secondary alcohols from the corresponding esters (D1-D4) and/or ketones (D1, D5 and D6). The art does, however, not disclose how the person skilled in the art, with a reasonable chance of success, would know how to produce the specific (1S) enantiomer of the present application. It is, therefore, considered that the skilled person would have to apply inventive skills to arrive at the subject-matter of the application. The inventive step of claims 1-15 is, thus, acknowledged.

4. Further comments

- 4.1 Claims 2 and 3 relate to the use of a biocatalyst to produce (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. This must be considered a mere desideratum since the skilled person would not know which biocatalyst to use. It is clear from the general knowledge in the art that not any biocatalyst would work, but rather only specific ones would be useful. This is further underlined by Tables 1 and 2 of the application which shows that only a limited number of the tested enzymes are useful in the method (see especially Table 2). The claims have to be redrafted to reflect this.
- 4.2 Claim 11 relates to the use of a biocatalyst to produce (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol from 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone. It is, however, clear from the description (page 41, lines 27-29) that only "horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH) catalysed the selective reduction of 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanone to (1S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. The claim has to redrafted to reflect this.
- 4.3 Claims 3 and 11 generally talk about production of an optically active isomer of 1-

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2005/002839

(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethanol. The description and examples of the application do, however, only give support for the production of the (1S) enantiomer. The claims have to be redrafted to reflect this.

- 4.4 The graphic indication of the (1R) and (1S) forms of the optically active -OH group in the formulas, at least, on pages 30, 32 and 42 seems to be inconsistent and should be checked and amended as necessary.
- 4.5 In agreement with the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, D4-D5 should be identified in the description and their relevant subject-matter briefly discussed.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2005/002839178
178A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P7/22 C07C33/46 C12P41/00

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)
C12P

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)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, 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	YAZBECK ET AL.: "Automated enzyme screening methods for the preparation of enantiopure pharmaceutical intermediates" ADV. SYNTH. CATAL., vol. 345, no. 4, 2003, pages 524-532, XP008056612 cited in the application the whole document ----- -/-	2-15

☒ 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

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2005

Date of mailing of the international search report

14/12/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P B 5018 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2005/002839

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	LIU H-L ET AL: "ENANTIOPURE BUILDING BLOCKS FOR CHIRAL DRUGS FROM RACEMIC MIXTURES OF SECONDARY ALCOHOLS BY COMBINATION OF LIPASE CATALYSIS AND MITSUNOBU ESTERIFICATION" CHIRALITY, WILEY-LISS, NEW YORK, US, vol. 14, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 25-27, XP008033385 ISSN: 0899-0042 cited in the application abstract	1-10
A	VÄNTTINEN E ET AL: "Combination of the Lipase-Catalysed Resolution with the Mitsunobu Esterification in One Pot" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 6, no. 7, July 1995 (1995-07), pages 1779-1786, XP004048155 ISSN: 0957-4166 cited in the application abstract page 1779, paragraph 1 - page 1780, paragraph 1	1-10
A	US 5 457 052 A (TSUBOI ET AL) 10 October 1995 (1995-10-10) abstract; claim 1	1-10
A	WO 02/077258 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY; PATEL, RAMESH; GOSWAMI, ANIMESH; CHU, LI) 3 October 2002 (2002-10-03) abstract; claim 1 page 2, line 30 - page 4, line 12	1,11-15
A	ITOH N ET AL: "Chiral alcohol production by NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase coupled with in situ regeneration of NADH" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 269, no. 9, May 2002 (2002-05), pages 2394-2402, XP002221911 ISSN: 0014-2956 cited in the application page 2394, right-hand column, line 3 - line 5 table 3	1,11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2005/002839

181
041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5457052	A	10-10-1995	NONE
WO 02077258	A	03-10-2002	BR 0208265 A CA 2441267 A1 CN 1498273 A CZ 20032496 A3 EP 1370677 A1 HU 0400261 A2 JP 2004532017 T MX PA03008437 A PL 364577 A1
			02-03-2004 03-10-2002 19-05-2004 17-12-2003 17-12-2003 28-09-2004 21-10-2004 29-01-2004 13-12-2004

181

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 183

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC

REFERENCIA	Radicación No.	7 15790
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/002839
	Fecha inicio fase nacional	26/03/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	2852
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

27 MAR. 2007

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-015790-00000-0000
Fec 2007-02-16 16:33:17 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folio 181



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

[4]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [4]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [4]
- ◆ Descripción de la invención [4]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [4]

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 se 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 trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 16 FEB. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia