

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490727 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.05(22) Дата подачи заявки
2022.09.14(51) Int. Cl. C12P 13/00 (2006.01)
C12P 17/02 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)
C07C 219/24 (2006.01)
C07C 223/04 (2006.01)
C07C 227/34 (2006.01)
C07C 229/28 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ (1r,4r)-4-ЗАМЕЩЕННЫХ ЦИКЛОГЕКСАН-1-АМИНОВ

(31) P2100325; P2200363
(32) 2021.09.15; 2022.09.13

(33) HU

(86) PCT/IB2022/058641

(87) WO 2023/042081 2023.03.23

(71) Заявитель:

РИХТЕР ГЕДЕОН НИРТ;
БУДАПЕШТИ МЮСАКИ ЭШ
ГАЗДАШАГТУДОМАНЬИ ЭДЪТЕМ
(HU)

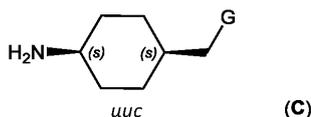
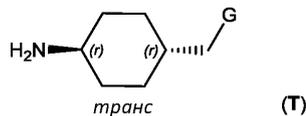
(72) Изобретатель:

Фаркаш Эмеше, Поппе Ласло,
Хорньянски Габор, Инце Даниель
Янош, Элеш Янош, Шанта-Белль
Эвелин, Мольнар Жофия Клара,
Семеш Йожеф, Шнайдер Анна, Чука
Паль (HU)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения (1r,4r)-4-замещенного циклогексан-1-амина [далее обозначенного как транс-4-замещенный циклогексан-1-амин] формулы (Т), исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (С) + формула (Т)) или любой их соли с использованием одного трансаминазного биокатализатора в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквиволярного до эквиволярного, в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока. В первом аспекте настоящего изобретения могут быть получены сложные эфиры 2-(транс-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, более предпочтительно - C₁₋₆алкильные сложные эфиры, в частности - сложный этиловый эфир 2-(транс-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты. Во втором аспекте настоящего изобретения могут быть получены содержащие защитные группы для гидроксила или не содержащие защитных групп транс-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амины, в частности - транс-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амин. В третьем аспекте настоящего изобретения могут быть получены защищенные 2-(транс-4-аминоциклогексил)ацетальдегиды, в частности - транс-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин.



A1

202490727

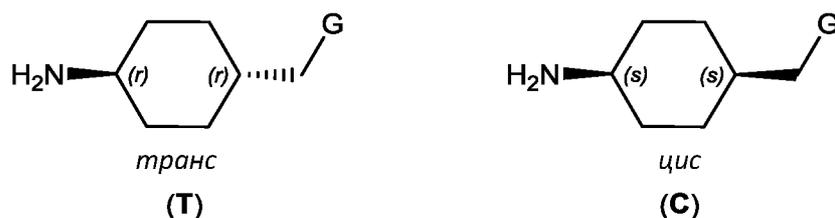
202490727

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ (1*r*,4*r*)-4-ЗАМЕЩЕННЫХ ЦИКЛОГЕКСАН-1-АМИНОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к новому способу получения (1*r*,4*r*)-4-замещенного циклогексан-1-амина [далее обозначенного как *транс*-4-замещенный циклогексан-1-амин] формулы (Т), исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (С) + формула (Т))



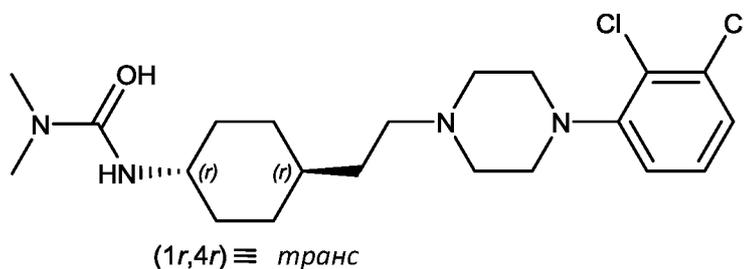
или любой их соли с использованием одного трансаминазного биокатализатора в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольного до эквимольного, в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока. В первом аспекте настоящего изобретения могут быть получены сложные эфиры 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, более предпочтительно – C₁₋₆-алкильные сложные эфиры, в частности – сложный этиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты. Во втором аспекте настоящего изобретения могут быть получены содержащие защитные группы для гидроксила или не содержащие защитных групп *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амины, в частности – *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амин. В третьем аспекте настоящего изобретения могут быть получены защищенные 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)ацетальдегиды, в частности – *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сложные эфиры 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, в частности – сложный этиловый эфир *транс*-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, являются превосходными исходными материалами для синтеза активных фармакологических агентов, в том числе – 3-((1*r*,4*r*)-4-(2-(4-(2,3-дихлорфенил)пиперазин-1-ил)этил)циклогексил)-1,1-диметилмочевины (обозначаемой как: *транс*-N-{4-[2-[4-(2,3-дихлорфенил)пиперазин-1-ил]этил]циклогексил}-N',N'-диметилмочевина], более

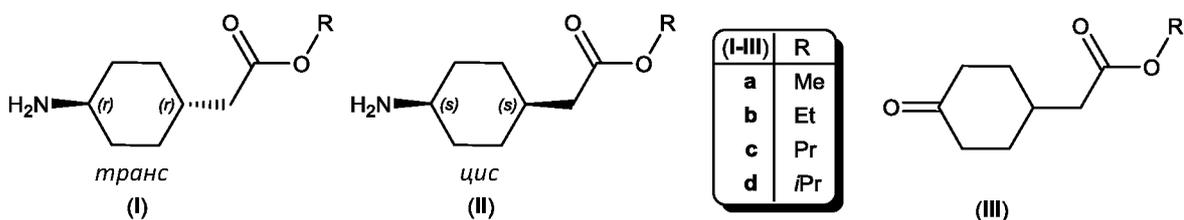
известной под названием Карипразин, синтез которой был впервые описан в Международной заявке на патент WO 2005/012266 A1.

Карипразин, продаваемый в Европе как Reagila® и в США как Vraylar®, является атипичным антипсихотиком (É. Ágai-Csongor et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 3437-3440 (2012), DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.03.104) для лечения шизофрении и биполярной мании со смешанными эпизодами (L. Citrome, Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 9, 193-206 (2013), DOI: 10.1517/17425255.2013.759211). Он является частичным антагонистом дофаминовых рецепторов (D3 и D2) с высокой селективностью в отношении D3-рецепторов (D3 антагонист) в центральной нервной системе.



Карипразин

Транс-4-замещенный циклогексанаминовый фрагмент (содержащий два центра псевдоасимметрии 1*r* и 4*r*, обеспечивающие *транс*-конфигурацию) является критическим элементом химической структуры активного фармацевтического агента Карипразина. Соответственно, для синтеза Карипразина можно использовать только диастереометрически чистую *транс*-изомерную форму (I) промежуточного соединения, и присутствие диастереомерной *цис*-формы (II) является нежелательным.

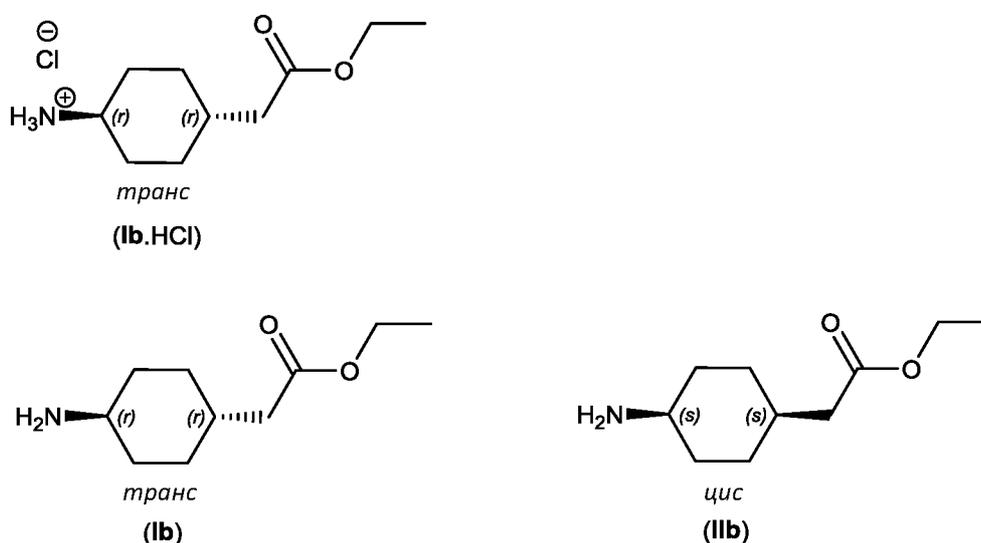


20

Стереохимия в сложном аминокэфире формулы (I) несомненно соответствует *транс*-форме (это означает, что 1- и 4-заместители расположены на двух противоположных сторонах «несложного» циклогексанового кольца), но разделение на основные стереогенные элементы фактически обусловлено

присутствием двух центров псевдоасимметрии в циклогексановом кольце ($1r,4r$) (центры псевдоасимметрии обозначают как r/s в системе Кана, Ингольда, Прелога (CIP; от англ.: Cahn, Ingold, Prelog); подробности см. в публикации L. Poppe et al. Stereochemistry and Stereoselective Synthesis, Wiley-VCH Verlag KGaA, Weinheim
 5 (2016), pp. 52-54. Важной особенностью этой системы является то, что если один центр псевдоасимметрии удален ($1r$ центр разрушается при дезаминировании до кетона (III), другой (в данном случае - $4r$) также устраняется без нарушения любой из четырех ковалентных связей, непосредственно присоединенных к центральному атому. В связи с этим система, обусловленная присутствием двух центров
 10 псевдоасимметрии, ведет себя скорее как один стереогенный элемент, поэтому обозначение одним стереодескриптором (*цис*- или *транс*-) является более подходящим.

Исходный материал – ($1r,4r$)-4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (далее обозначенный как сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорид), характеризующийся формулой
 15 (Ib·HCl), получают в промышленном масштабе с высоким качеством посредством простых стадий реакции согласно производственному процессу, описанному в публикации WO2010/070368.



20 В этом способе 2-(4-нитрофенил)уксусную кислоту, дешевый и легкодоступный в большом количестве промышленный химический сырьевой материал гидрогенизируют в водной среде с использованием Pd/C катализатора. На первой стадии нитрогруппу и затем ароматическое кольцо насыщают, затем диастереомерную смесь 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты этерифицируют в

среде этанола в реакции, катализируемой кислотой, и из полученной изомерной смеси сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (Ib+IIb) получают чистый конечный продукт – сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорид (Ib·HCl) посредством селективной кристаллизации.

При использовании этой процедуры сложные циклогексилуксусные эфиры (I+II), например – производные сложных этилового (Ib+IIb) и пропилового (Ic+IIc) эфиров, получают в виде смеси *транс/цис*-изомеров в соотношении, равном примерно 1:1, которую можно разделить на *транс*- и *цис*-продукты (соединения I и II, соответственно) с относительно хорошим выходом *транс*-диастереомера (I).

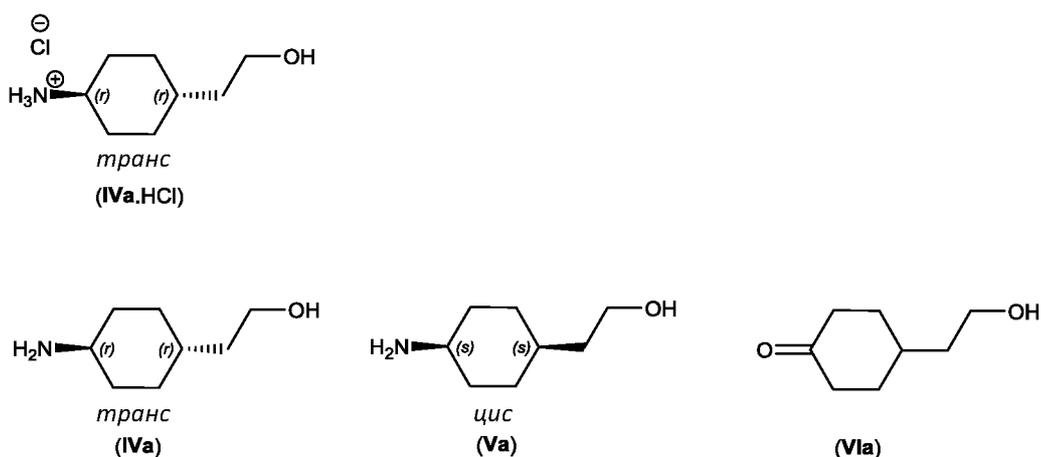
Согласно описанию WO2010/070368, сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорид (Ib·HCl) можно выделить с 40%-ным выходом с исключительно высокой диастереомерной чистотой после обработки ацетонитрилом. Обычно *транс/цис*-смесь (Ib+IIb) разделяют посредством кристаллизации.

Согласно публикациям X.-W. Chen et al. (Synthesis 48(18), 3120-3126 (2016), DOI: 10.1055/s-0035-1561865; Eur. J. Med. Chem. 123, 332-353 (2016), DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.07.038), N-ацилированные (N-ацетильные, N-Вос, N-(N'-дметиламино)карбонильные) производные сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорида (Ib·HCl) можно выделить посредством прямой перекристаллизации в этаноле из смеси *цис/транс*-изомеров с умеренным фактическим выходом (64% и 62% для N-ацетильных и N-(N'-дметиламино)карбонильных производных, соответственно) и превосходной диастереомерной чистотой (*транс:цис* приблизительно 100:0).

Согласно описанию CN2015/10649822, в качестве сырьевого материала использован 4-аминоциклогексанон без защиты аминогруппы. С этим соединением проводят реакцию Виттига со сложным метиловым эфиром (диметоксифосфинил)уксусной кислоты или со сложным этиловым эфиром (диэтоксифосфинил)уксусной кислоты, и затем после каталитической гидрогенизации полученного неочищенного алкил-2-(*транс/цис*-4-аминоциклогексиден)ацетата (Ia+IIa или Ib+IIb) его подвергают кристаллизации высаливанием для получения более чистого *транс*-продукта (соединение Ia или Ib с *транс:цис* соотношением от 95:5 до 99,9:0,1).

Обычно после каталитического восстановления смесь *транс*- и *цис*-изомеров соответствующего сложного эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II) разделяют посредством кристаллизации и побочный *цис*-продукт отбрасывают. Также возможна изомеризация побочного *цис*-продукта (II) с получением смеси *цис*- и *транс*-изомеров согласно способу R.S. Muromova et al. (Zhurnal Vsesoyuznogo Khimicheskogo Obshchestva im. D. I. Mendeleeva, 10(6), 711-712 (1965); Chem. Abstr. 64, 51662 (1966); USSR, SU177422 1965-12-18: Chem. Abstr. 64, 103634 (1966)). В этом способе этил-2-(4-нитрофенил)ацетат гидрогенизировали над Rh-Pt при 60°C и 100 атм в EtOH до 98%-ной смеси *цис/транс*-изомеров сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединения Ib+IIb), которые гидролизovali до смеси изомеров свободной кислоты. Обработка изомеров (соединение Ib или соединение IIb) или смеси изомеров сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединения Ib+IIb) 29%-ной H₂O₂ в водном растворе NaOH в присутствии вольфрамовой кислоты дала 80% оксима этил-4-оксоциклогексилацетата, который через 12 часов при 100°C в водном растворе NaOH дал соответствующую изомерную композицию оксима свободной кислоты. Электролитическое восстановление оксима свободной кислоты в смеси EtOH-10% H₂SO₄ при 10-12°C и 3 А·дм⁻² дало смесь 2-(*цис/транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, содержащую 50% *транс*-изомера.

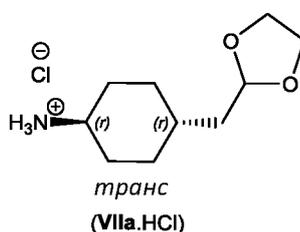
Согласно описанию CN2018/10649822 (Chem. Abstr. 172, 252756 (2019)), Карипразин можно также получить из *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-аминия хлорида (IVa·HCl).



Это соединение, однако, можно получить из 2-(4-нитрофенил)этан-1-ола посредством гидрогенизации в автоклаве под высоким давлением с дорогим рутениевым катализатором с получением *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-(2-

5 гидроксипропан-2-ил)циклогексан-1-аминов (соединение IVa + соединение Va) с последующим разделением изомеров с поддержкой кристаллизацией. В случае этих диастереомеров (соединение IVa + соединение Va) уменьшение одного центра псевдоасимметрии (например, 1*r*-центр отсутствует в кетоне (VIa)) также удаляет другой (4*r*).

Согласно описанию WO2002006229 (Chem. Abstr. 136, 134675 (2002)), гетероциклические аминоспиртовые агонисты адренергического β-3 рецептора, напоминающие по структуре Карипразин, можно получить из *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминия хлорида (VIIa·HCl).



10

Способ включает первоначальную конверсию аминного фрагмента *транс*-амина (соединение VIIa) в форме свободного основания в производное *N,N'*-диметилмочевины с последующим высвобождением альдегидного фрагмента и соединением с подходящим реагентом – вторичным амином.

15

Задача настоящего изобретения состояла в усовершенствовании наиболее распространенного в настоящее время способа производства, в котором *цис*-изомер (формула II) до сих пор перерабатывают как отходы, и в обеспечении возможности преобразования максимально большой доли побочного *цис*-продукта (формула II) в желаемый *транс*-изомер (формула I) в ходе одной стадии в мягких условиях.

20

Вначале авторы изобретения предположили, что разделение *цис*- и *транс*-изомеров сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединения I+II) можно осуществить гораздо более эффективно с использованием биокаталитических способов, чем в случае способов разделения, являющихся частью традиционного современного способа производства. Неожиданно авторы обнаружили, что один фермент может катализировать не только выделение *цис*-диастереомера (соединение II), но и способ динамической изомеризации *цис*-диастереомера сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил) уксусной кислоты (соединение II) в желаемое промежуточное *транс*-соединение (I).

25

Благодаря бурному развитию биоинформатики, энзимологии и молекулярной биологии, практические применения биокаталитических способов могут быть хорошо разработаны и в настоящее время могут стать конкурентоспособными способами.

5 Хотя для сходных родственных соединений в литературе описаны способы, катализируемые кеторедуктазой (восстановление 4-пропилциклогексанона и 4-этилциклогексанона до соответствующего *цис*- и *транс*-спирта, соответственно) и трансминазой (преобразование производных метил-2-(3-оксоциклогексил)ацетата и 2-метилциклогексанона в соответствующие амины), до настоящего времени не
10 были разработаны биокаталитические способы для стереоселективного получения каких-либо диастереомеров сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II).

 Была высказана гипотеза, что катализируемый трансминазой (ТА) способ получения алкил-2-(*транс*-4-аминоциклогексил)ацетата (соединение I), в частности,
15 этил-2-(*транс*-4-аминоциклогексил)ацетата гидрохлорида, описываемого химической структурой (Ib·HCl), может быть эффективным для достижения этой цели.

 Кроме того, казалось возможным, что способ можно будет осуществить не только в периодическом режиме, но и в режиме непрерывного потока. В литературе
20 можно найти много примеров иммобилизации трансминаз и их использования в режиме непрерывного потока, что может повысить стабильность, активность и эффективность ферментов и позволить их обратное выделение и использование в экологически чистых и интенсифицированных способах. Ферменты можно
25 использовать в качестве биокатализаторов в выделенной (очищенной) форме, в форме экстракта клеток-хозяев, которые продуцируют их (дикого типа или рекомбинантные), или даже встроенными в цельную клетку.

 Трансминазы (ТА) катализируют редокс-нейтральный перенос аминогруппы от донора аминогруппы на карбонильное соединение. Работа ТА зависит от кофактора пиридоксаль-5'-фосфата (PLP; от англ.: pyridoxal-5'-phosphate), который
30 служит переносчиком электрона и азота. Наиболее часто используемыми применениями ТА являются стереоселективные способы, целью которых является один энантиомер хирального амина. Реакции, катализируемые одной ТА и направленные на получение хирального амина, можно разделить на два различных типа подходов: (i) в асимметричном синтезе (AS; от англ.: asymmetric synthesis),

начинающемся с прохирального кетона, перенос амина от подходящего донора аминокетона дает хиральный амин (S. Mathew et al. ACS Catal. 8(12), 993-1001 (2012), DOI: 10.1021/cs300116n; D. Koszelewski et al. Trends Biotechnol. 28(6), 324-332 (2010), DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.03.003), тогда как (ii) в кинетическом расщеплении (KR; от англ.: kinetic resolution) предпочтительный энантиомер рацемического амина служит донором аминокетона для простого акцептора амина, что приводит к смеси остаточного энантиомера рацемического амина и кетона, соответствующего реагирующему энантиомеру (D. Pressnitz et al. ACS Catal. 3(4), 555-559 (2013), DOI: 10.1021/cs400002d).

10 Применение этих подходов зависит от доступности исходных материалов – кетонов или рацемических аминов. С практической точки зрения (достижимость 100%-ной конверсии), более предпочтительным типом реакции является асимметричный синтез, но из-за часто неблагоприятного термодинамического равновесия направления асимметричной реакции, более удобным является кинетическое расщепление. Несмотря на определенные термодинамические проблемы, феномены ингибирования субстратом и продуктом, которые могут мешать его доминированию, описанные выше способы получения хиральных аминов показывают, что промышленное применение ТА становится все более распространенным.

20 Способ получения, раскрытый C. K. Savile et al. (Science 329(5989), 305-309 (2010), DOI: 10.1126/science.1188934), иллюстрирует применимость ТА для осуществления промышленного производства. Способ разработан компаниями Merck & Co. и Codexis с использованием технологии белковой инженерии CodeEvolver® в отношении лекарственного препарата (*R*)-Ситаглиптина (товарный знак Januvia), используемого при лечении диабета. Для достижения целей синтеза был разработан новый вариант первоначальной ТА с использованием подхода блуждающего субстрата, моделирования и мутации на первом этапе с последующей прямой эволюцией в зрелую форму ТА, за счет чего можно исключить исходную катализируемую родием гидрогенизацию асимметричного енамина (при давлении, равном 250 фунтам/кв. дюйм, что соответствует 1724 кПа) и сократить время синтеза. Обобщая сказанное, 27 мутаций было выполнено в исходной (*R*)-селективной ATA117 (*Arthrobacter* sp.) трансаминазе для получения конечного биокатализатора с расширенным связывающим карманом для субстратов объемного типа, имеющего повышенную на 4 порядка активность по сравнению с исходной ATA117 и повышенную устойчивость к *i*PrNH₂ (0,5-1 М), органическому

растворителю (диметилсульфоксид (ДМСО) 5-50%), нагреванию (45 °С) и концентрации кетона (100 г/л, 250 мМ). По сравнению со способом, катализируемым металлом, этот катализируемый ТА способ (6 г/л трансаминазы может преобразовать 200 г/л кетона проситаглиптина) дает (*R*)-ситаглиптин с энантиомерным избытком >99,9%, с увеличением общего выхода на 10-13%, с повышением производительности на 53% и общим снижением отходов на 19%.

С помощью двух ТА с предпочтением к противоположным энантиомерам возможна конверсия рацемического амина до любого из энантиомеров посредством так называемой дерацемизации (N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(2), 115-121 (2010), DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.11.027). Дерацемизация с использованием двух стереокомплементарных ТА включает стадию кинетического расщепления с помощью одной ТА с последующим асимметричным синтезом образующегося кетона с помощью стереокомплементарной ТА. Если рассматривать интерконверсию одного аминного энантиомера в противоположный энантиомер через соответствующий кетон как рацемизацию, то процесс дерацемизации можно также обозначить как динамическое кинетическое расщепление (DKR; от англ.: dynamic kinetic resolution).

В публикации D. Koszelewski et al. (*Eur. J. Org. Chem.* (14), 2289-2292 (2009), DOI: 10.1002/ejoc.200801265) дерацемизацию α -хиральных первичных аминов выполняли с использованием двухстадийного одnoreакторного каскадного способа с двумя стереокомплементарными ТА. После завершения стадии кинетического расщепления (первая стадия) ТА разрушали тепловым шоком и добавляли вторую ТА с противоположным стереопредпочтением совместно с лактатдегидрогеназой в общую реакционную систему, чтобы сдвинуть равновесие реакции в сторону желаемого амина. Любую энантиомерную форму рацемического амина можно синтезировать посредством изменения порядка применения двух различных стереоселективных ТА.

Публикация G. Shin et al. (*Chem. Commun.* 77(49), 8629-8631 (2013), DOI: 10.1039/c3cc43348j) обеспечивает решение для устранения недостатка способа, описанного выше (тепловая инактивация первой ТА при KR), за счет применения акцептора аминогруппы, который воспринимается только первой ТА из двух противоположных энантиоселективных ТА. Таким образом разработана одnoreакторная одностадийная дерацемизация, однако по-прежнему необходимы по меньшей мере два фермента.

Согласно публикациям C. S. Fuchs et al. (Adv. Synth. Catal. 360(4), 768-778 (2018), DOI: 10.1002/adsc.201701449) и WO 2016/075082, получение Прегабалина и Бриварацетама осуществляли с использованием энантиокомплементарных способов динамического кинетического разделения, приводивших к получению β-хиральных первичных аминов из соответствующих рацемических смесей β-хиральных альдегидов посредством катализируемого ТА энантиомерселективного аминирования с участием ТА с соответствующим энантиопредпочтением в сочетании с химической рацемизацией, обусловленной имин-енаминным таутомеризмом основания Шиффа субстрата с $i\text{PrNH}_2$.

Что касается интерконверсии энантиомеров, то стратегия ферментативной рацемизации α-хиральных первичных аминов описана в публикации D. Koszelewski et al. (Chem. Eur. J. 17(1), 378-383 (2011), DOI: 10.1002/chem.201001602), здесь катализ осуществляется парой стереокомплементарных ТА в присутствии симметричных кетонных/аминных косубстратов, которые служат переносчиками аминокетонной группы. Другим подходом, раскрытым в этой публикации, является биокаталитическая кросс-рацемизация двух различных энантиокомплементарных α-хиральных первичных аминов через кетонные интермедиаты с использованием двух стереокомплементарных ТА [из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA), ATA-117 или ATA-113] в отсутствие дополнительного внешнего симметричного кетона в качестве переносчика аминокетонной группы и внешнего донора аминокетонной группы.

Согласно публикации F. Ruggieri et al. (ChemCatChem 10(21), 5012-5018 (2018), DOI: 10.1002/cctc.201801049), рацемизацию (*R*)- или (*S*)-1-метил-3-фенилпропиламина можно выполнить с использованием двух энантиокомплементарных ТА [из *Chromobacterium violaceum* (CvS-TA) и из *Aspergillus oryzae* (AoR-TA)] и минимального количества пирувата/аланина в качестве косубстрата.

Кроме энантиотопной селективности (при асимметричном аминировании прохирального кетона с энантиотопными сторонами) и энантиомерной селективности (при кинетическом разделении посредством дезаминирования рацемического α-хирального первичного амина) с целью получения энантиоочищенных хиральных аминов, в известной мере сходную диастереотопную селективность (при асимметричном аминировании кетона с диастереотопными сторонами) или диастереомерную селективность (при диастереомерном разделении посредством дезаминирования диастереомерной смеси α-хирального/прохирального первичного

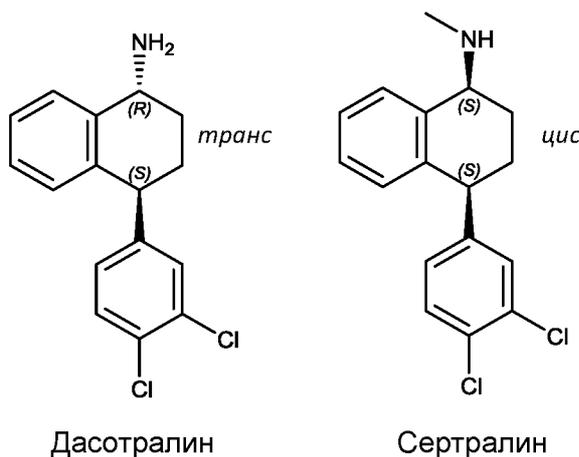
амин) ТА также использовали в нескольких случаях для достижения различных синтетических целей (определение этих типов стереоселективности см. в публикации L. Poppe et al. *Stereochemistry and Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH Verlag KGaA, Weinheim (2016), pp. 127-129).

5 Стереохимически более сложными случаями являются катализируемые ТА преобразования рацемических кетонов, в которых энантиомерная селективность (между двумя энантиомерами рацемического кетона) может проявляться параллельно с диастереотопной селективностью (между *Re* и *Si* сторонами прохирального центра С-атома кетона). В зависимости от того, какой тип
10 селективности проявляется, и какие соединения можно уравновесить химически или ферментативно, разработаны протоколы ТА-катализа, названные динамическим кинетическим разделением, например – синтез α -алкил- β -аминоамидов согласно публикации A. Mourelle-Insua et al. (*Catal. Sci. Technol.* 9(15), 4083-4090 (2019), DOI: 10.1039/C9CY01004A), в которой исходные α -алкил- β -кетоамиды
15 преобразовывали в α -алкил- β -аминоамиды с высоким энантиомерным избытком (вследствие высокой диастереотопной селективности) и диастереомерным отношением в диапазоне от умеренного до высокого (вследствие энантиомерной селективности в диапазоне от умеренной до хорошей, с различными уровнями химической рацемизации).

20 В своей работе J. Limanto et al. (*Org. Lett.* 16, 22716-22719 (2014), DOI: 10.1021/ol501002a) использовали ТА-катализ для избирательного преобразования рацемического кетона в интермедиат (промежуточный продукт) лекарственного препарата Вернакаланта (Vernalakant). Здесь также параллельно могут существовать две селективности [энантиомерная селективность
25 (различающая энантиомеры рацемического кетона) и диастереотопная селективность (на сторонах карбонильных групп)]. Энантиомерно чистое получение Вернакаланта требует, чтобы кроме обеих селективностей также была проведена рацемизация (то есть динамическая изомеризация) энантиомеров кетона в условиях с pH приблизительно 10. Соответствующий вариант ТА, демонстрирующий высокую
30 энантиомерную и высокую диастереотопную селективность, получают посредством прямой эволюции с образованием *транс*-изомера с высокой селективностью и фактическим выходом более 80% (*транс:цис* > 95:1, энантиомерный избыток >99,5%).

Другой пример катализируемого ТА способа типа DKR раскрыт Z. Peng et al. (Org. Lett. 16, 860-863 (2014), DOI: 10.1021/ol403630g). Исходя из рацемического 2-замещенного производного 4-пиперидона, соответствующий *транс*-амин получали с использованием трансаминазы АТА-036 (с диастереомерным отношением 10:1 при энантиомерном избытке, равном 99%). Способ является энантиомерселективным (разделение) и диастереотопселективным (аминирование) в отношении кетона. Рацемизация остаточного кетона посредством кольчато-цепной таутомерии субстрата обеспечивает DKR процесс, приводящий к 85%-ной конверсии рацемического кетона в желаемый (*2R,4R*)-амин.

Кроме Карипразина с *транс*-конфигурацией из-за присутствия двух центров псевдоасимметрии (*1r,4r*), другие лекарственные препараты, такие как Сертралин (Sertraline), Дасотралин (Dasotraline), также содержат в своей структуре 4-замещенные циклогексанаминовые фрагменты с *цис*- или *транс*-конфигурацией.



Однако из-за конденсированного ароматического кольца в бициклической системе, нарушающего плоскую симметрию 4-замещенных циклогексанаминовых/циклогексаноновых систем, присутствие двух реальных центров асимметрии приводит к существованию у этих лекарственных препаратов четырех возможных стереоизомеров. Чтобы разделять четыре возможных стереоизомера, важно иметь возможность селективно формировать соответствующие стереогенные центры на кольце или иметь энантиомерное/диастереомерное разделение.

Работа D. P. Gavin et al. (Sci. Rep. 9, 20285 (2019), DOI: 10.1038/s41598-019-56612-7) показала, что ТА-катализируемое дезаминирование рацемических аминов с дополнительным дистантным стереоцентром упрощает процесс KR, если энантиомерная и диастереотопная селективности высоки, а дистантный

стереоцентр стабилен. Недавно выделенную трансаминазу из *Pseudovibrio* sp. (*PsS*-TA) и ранее известную *CvS*-TA испытали в отношении получения деметилированных диастереомеров Сертралина (*цис*- и *транс*-Норсертралин в Схеме 1).

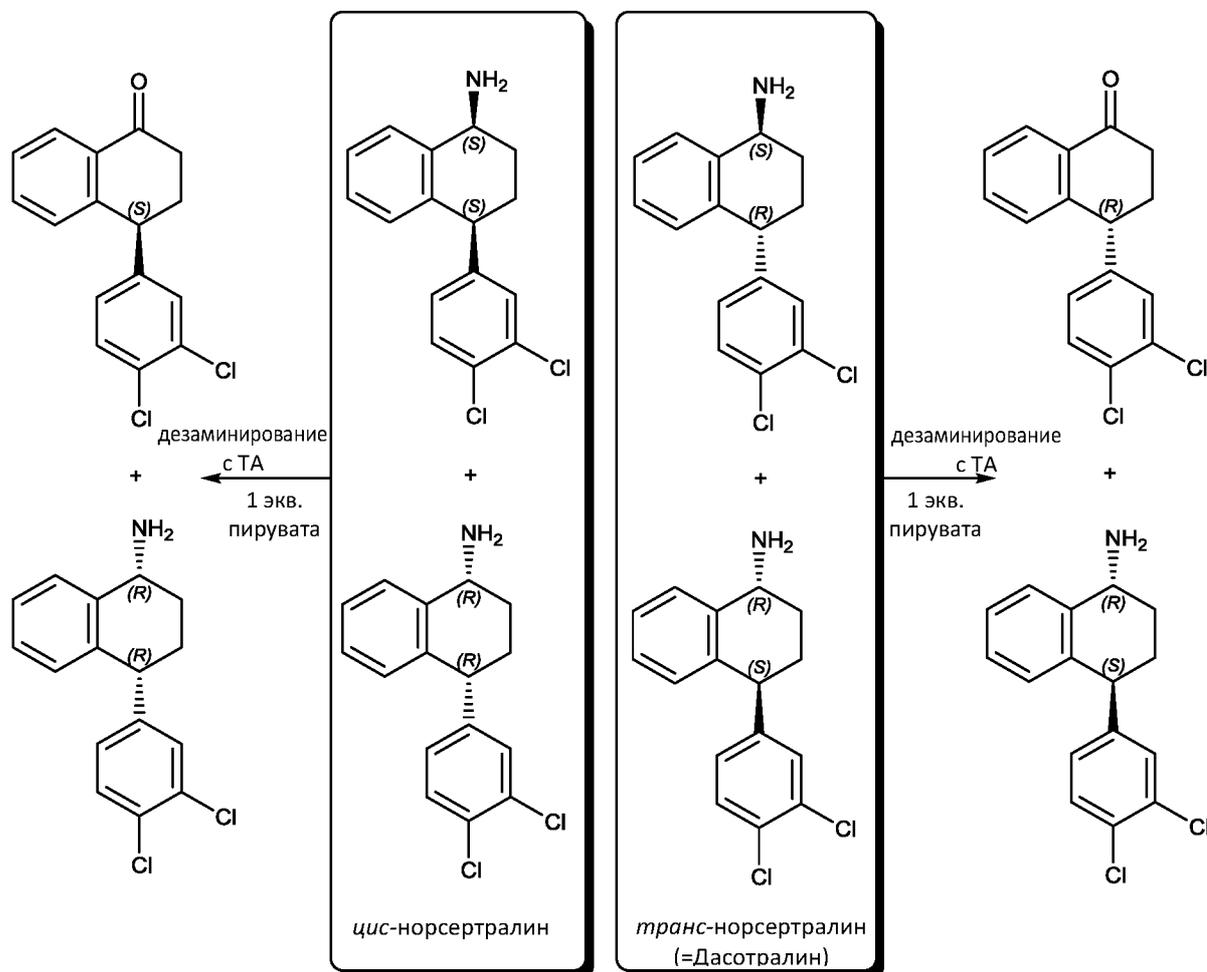


Схема 1

10 KR посредством дезаминирования рацемического *цис*-изомера приводит к превосходной конверсии при использовании обеих ТА (вследствие высокого уровня энантиомерной селективности), оставляя (1*R*,4*R*)-изомер с высокой чистотой (энантиомерный избыток >99%) совместно с образующимся (*S*)-кетон (вследствие высокого уровня диастереотопной селективности). В случае рацемического *транс*-изомера только *Cv*-ТА показала значимую активность, где после примерно 50%-ной конверсии из (1*S*,4*R*)-изомера образовался (*R*)-кетон (с энантиомерным избытком приблизительно 80%), тогда как оставшийся (1*R*,4*S*)-амин
15 был получен с энантиомерным избытком приблизительно 95%. Это способы

показали, что обе (*S*)-селективные ТА являются гораздо более чувствительными к конфигурации связывающего амин стереогенного элемента [(*S*)-селективного], чем к конфигурации более дистантного стереоцентра.

5 В публикации US2019/0390235 раскрыто, что Дасотралин можно получить из соответствующего (*S*)-кетона посредством восстановительного аминирования с использованием (*R*)-селективной трансаминазы (в этом случае возможна только диастереотопная селективность), что приводит к получению ожидаемого (1*R*,4*S*)-Дасотралина с энантиомерным избытком, превышающим 99%.

10 Хотя сами проявления диастереотопной селективности в отношении 4-замещенных циклогексанонов или диастереомерной селективности в отношении 4-замещенных циклогексиламинов в случае ТА могут быть близкими аналогами часто используемой энантиотопной селективности (при восстановительном аминировании прохирального кетона) или энантиомерной селективности (при окислительном дезаминировании α -хирального первичного амина), соответственно, как показывают
15 приведенные выше примеры, авторы настоящего изобретения обнаружили способы получения на основе ТА для циклогексиламинов с различными замещениями с использованием диастереотопной селективности или диастереомерной селективности только в комбинации с другими типами селективностей.

20 При разработке способов получения с ТА-катализом для получения сложных эфиров 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) с особым вниманием к сложному этиловому эфиру (Ib) с использованием одной ТА вначале авторы рассмотрели два варианта, изображенные на Схеме 2, с использованием чистого проявления возможной диастереотопной селективности (Схема 2А) или диастереомерной селективности (Схема 2В) ТА.

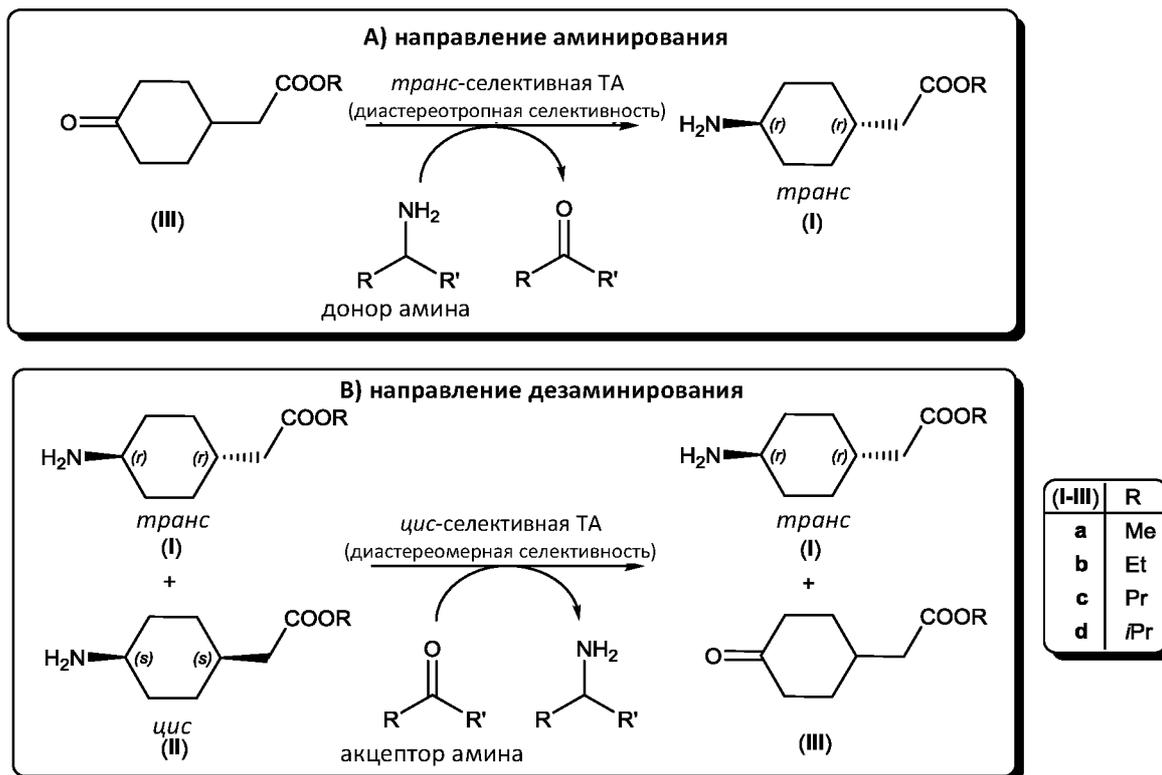


Схема 2

ТА с *транс*-селективностью (Схема 2А) могут обеспечивать преобразование (4-алкоксикарбонилметил)циклогексанона (III) прямо в желаемый сложный эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I), тогда как ТА с *цис*-селективностью (Схема 2В) могут быть использованы для диастереомерного разделения, приводящего к легко разделяемой смеси желаемого сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) и соответствующего (4-алкоксикарбонилметил)циклогексанона (III), образующегося из *цис*-изомера (II).

Направленный скрининг авторов изобретения варианта А) с использованием трех (*S*)-селективных ТА и трех (*R*)-селективных ТА для диастереотопного селективного аминирования (4-этоксикарбонилметил)циклогексанона (соединение IIIb) с использованием соответствующего энантиомера α -метилбензиламина в качестве донора аминогруппы не выявил ТА с *транс*-селективностью, подходящих для прямого получения желаемого сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединение Ib). Хотя не было обнаружено ТА с селективностью, требуемой для образования сложного *транс*-эфира (соединение I), ТА с хорошей *цис*-селективностью пригодны для получения более труднодоступного сложного *цис*-эфира (соединение II) с хорошим диастереомерным избытком.

Цис-диастереомерное предпочтение является требованием для варианта В), обеспечивающего получение *транс*-изомера (соединение I) посредством диастереомерного расщепления *транс/цис*-изомерной смеси аминов (соединения I+II). К счастью, высокий уровень *цис*-селективности при аминировании (4-этоксикарбонилметил)циклогексанона (соединение IIIb) был обнаружен в случае VfS-TA и варианта CvS-TA, приводивших к низкой или умеренной конверсии, соответственно, с хорошим диастереомерным избытком (>90% de_{cis}). Поскольку диастереомерная смесь *транс/цис*-амин (соединения I+II) является более легкодоступной, чем соответствующий кетон (соединение III), разделение изомеров диастереомерной смеси (соединения I+II) представляется перспективным способом.

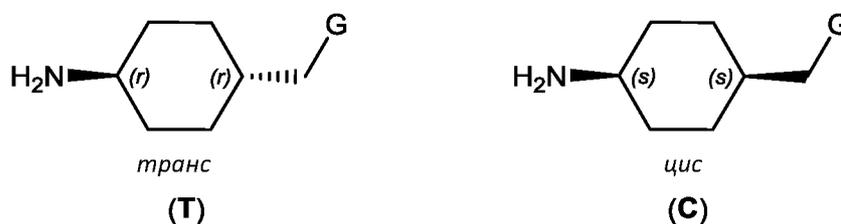
Хотя в аналогичных энантиомерселективных способах, имеющих целью получение энантиочистых препаратов хиральных аминов и начинающихся от рацемических соединений, из-за наличия в субстрате химически чувствительного фрагмента были необходимыми или применение стереокомплементарных ТА, или неферментативная рацемизация для преодоления конверсионных ограничений кинетического разделения для содержания реагирующего энантиомера, что приводило к динамическому кинетическому разделению или дерацемизации, не ожидалось такого эффекта при разделении изомеров диастереомерной смеси с использованием одной ТА.

Эксперименты авторов изобретения с диастереомерным разделением с использованием *цис*-селективных ТА (вариант CvS-TA и VfS-TA), в которых использовали пируват в качестве акцептора аминогруппы для дезаминирования *цис*-диастереомера изомерных сложных этиловых эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединения Ib+IIb), дали неожиданные и удивительные результаты. При определенных длительностях реакции, зависевших от природы ТА-биокатализатора и типа и количества донора аминогруппы, была получена смесь образующегося кетона (соединение IIIb) в меньшем количестве, чем было израсходовано *цис*-изомера (соединение IIb), и диастереомерно обогащенного *транс*-изомера (соединение Ib, до более 98% de_{trans}) в количестве, превышавшем исходное содержание *транс*-изомера (соединение Ib) (молярная фракция Ib, x_{trans} , увеличилась до более 85%). Эти результаты указывают на неожиданную динамическую изомеризацию содержания *цис*-изомера (молярной фракции соединения IIb: x_{cis}) до *транс*-диастереомера (соединение Ib) одной ТА, проявлявшей высокую *цис*-селективность в направлении диастереотопселективного аминирования кетона.

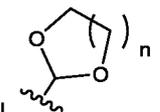
Таким образом, настоящее изобретение относится к катализируемой одной трансаминазой динамической изомеризации *транс/цис*-диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (C+T) для синтеза *транс*-4-замещенных циклогексан-1-аминов (T), которую можно осуществить в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ по настоящему изобретению относится к получению (1*r*,4*r*)-4-замещенных циклогексан-1-аминов [равнозначное наименование – *транс*-4-замещенные циклогексан-1-амины] формулы (T), исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (C) + формула (T))



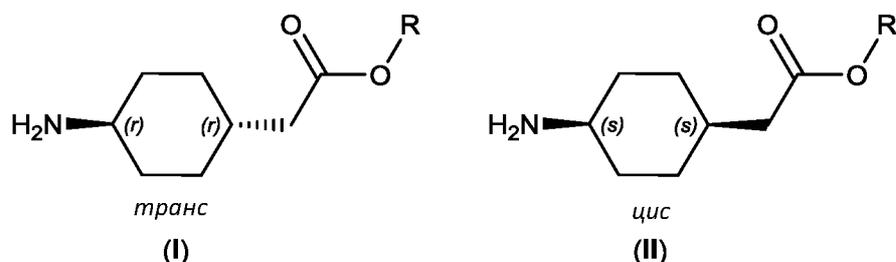
или любой их соли, причем в формуле (T) и в формуле (C) G обозначает заместитель, выбранный из

- атома водорода;
- 15 – C₁₋₆ алкильной группы;
- сложноэфирного фрагмента (-COOR), где R представляет собой подходящую алкильную, аралкильную или арильную группу, предпочтительно – C₁₋₆ алкильную группу, более предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп;
- 20 – группы CH₂-OR', где R' представляет собой атом водорода или защитную группу для гидроксила;
- защищенной альдегидной группы формулы , где n является целым числом от 1 до 2;
- замещенной или незамещенной арильной группы, предпочтительно – фенильной группы; или
- 25

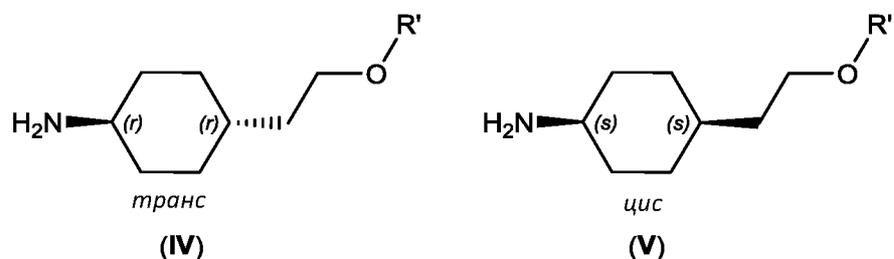
- аралкильной группы, предпочтительно – бензильной группы,

таким образом, что диастереомерная смесь реагирует с одним трансаминазным биокатализатором в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от 5 субэквимольного до эквимольного.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к получению сложных эфиров 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты формулы (I), исходя из диастереомерной смеси сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула (I) + формула (II)), или любой их соли с использованием одного 10 трансаминазного биокатализатора в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольного до эквимольного.

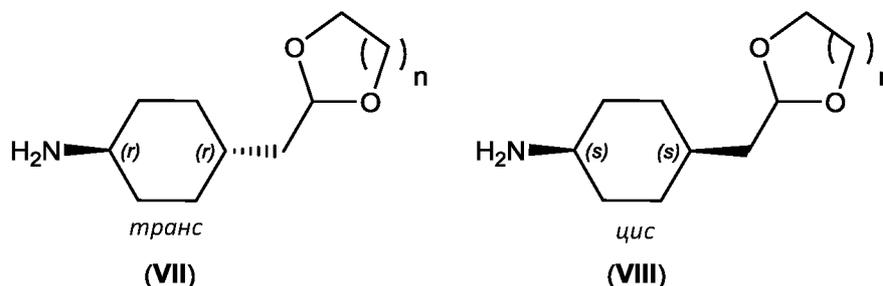


Во втором аспекте настоящее изобретение относится к получению 15 содержащих защитную группу для гидроксила или не содержащих защитных групп *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-аминов формулы (IV), исходя из соответствующей *транс/цис*-диастереомерной смеси (соединения IV+V), или любой их соли с использованием одного трансаминазного биокатализатора в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольного до 20 эквимольного.



В третьем аспекте настоящее изобретение относится к получению защищенных 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)ацетальдегидов (VII) из соответствующей *транс/цис*-диастереомерной смеси (соединения VII+VIII) с

использованием одного трансаминазного биокатализатора в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольного до эквимольного.



5 Способ по настоящему изобретению может быть осуществлен как в периодическом режиме, так и в режиме непрерывного потока.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Технологическое решение по настоящему изобретению является, в общем и целом, подходящим для получения (1*r*,4*r*)-4-замещенных циклогексан-1-аминов [иными словами – *транс*-4-замещенных циклогексан-1-аминов] формулы (Т), исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула С + формула Т), как указано выше. Однако изобретение включает несколько аспектов и вариантов осуществления, представляющих особый интерес.

15 Прежде всего, настоящее изобретение предусматривает способ, включающий катализируемую одной трансаминазой динамическую изомеризацию *транс/цис*-диастереомерной смеси сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II) для синтеза сложных эфиров 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I). Но в то же время способы динамической изомеризации также могут быть использованы для получения *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амина формулы (IVa) или *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амина формулы (VIIa) из соответствующих *цис/транс*-диастереомерных смесей 4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-аминов (формула (IVa) + формула (Va)) или 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминов (формула (VIIa) + формула (VIIIa)), соответственно, с использованием одного трансаминазного биокатализатора в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в субэквимольных количествах.

20

25

Сложные эфиры 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) используют в синтезе активных фармацевтических агентов. Более конкретно, для

синтеза активных фармацевтических агентов, в которых используют диастереомерно чистые *транс*-изомерные формы сложных C₁₋₆-алкильных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты. В частности, продукты сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (Ib) используют в синтезе *транс*-N-{4-[2-[4-(2,3-дихлорфенил)пиперазин-1-ил]этил]циклогексил}-N',N'-диметилмочевины, известной под названием Карипразин. *Транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амин (IVa) или *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин (VIIa) также можно использовать в альтернативных способах синтеза, ведущих к получению Карипразина.

10 В предпочтительно используемых сложных эфирах группа R в формуле I представляет собой C₁₋₆-алкильную часть, содержащую от 1 до 6 атомов водорода, с неразветвленной или разветвленной цепью.

Химическая структура лекарственной субстанции Карипразина содержит 4-замещенный циклогексанаминный фрагмент. Поэтому важно селективно сформировать два псевдоасимметричных центра с соответствующим пространственным расположением заместителей на кольце [то есть, (1*r*,4*r*)]. На практике это конкретно означает, что можно использовать только диастереомерно чистую *транс*-изомерную форму этил-2-(4-аминоциклогексил)ацетата HCl (Ib·HCl), и что необходимо или селективное формирование этого диастереомера (Ib), или разделение двух диастереомеров промежуточного соединения (Ib+IIb).

Как указано выше, исходный материал – сложный этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорид (Ib·HCl) – в промышленном масштабе получают с использованием простых стадий реакции и с высоким качеством в способе производства согласно WO2010/070368. При использовании этой процедуры можно получить производные сложного эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, например – производные метилового, этилового или пропилового сложных эфиров, в форме смеси *цис*/*транс*-изомеров в соотношении, примерно равном 1:1 (соединения Ia+IIa, Ib+IIb или Ic+IIc, соответственно). Эту смесь (I+II) разделяют на желаемый *транс*-продукт (I) и побочный *цис*-продукт (II) посредством кристаллизации. Обычно побочный *цис*-продукт перерабатывают как отходы, или его можно рециркулировать на стадию разделения посредством изомеризации с получением смеси *цис*- и *транс*-соединений (I+II).

Авторы настоящего изобретения попытались превратить практическое применение биокаталитического способа на основе трансаминазы в конкурентоспособное технологическое решение для разделения диастереомеров с использованием периодического или непрерывного режимов способа.

5 Неожиданно было обнаружено, что этот вновь разработанный способ превосходит относительно хороший выход продукта, получаемый при традиционном способе разделения, ограниченном содержанием исходного *транс*-изомера (соединения I), и поэтому обеспечивает возможность получения *транс*-изомера (соединения I) значительно более эффективным путем.

10 Авторы изобретения разработали биокаталитический способ, в котором большую часть содержания *цис*-изомера (соединения II) в диастереомерной *цис/транс*-смеси (соединения I+II) можно изомеризовать с использованием одной ТА и субэквимольных количеств подходящего акцептора аминогруппы, что приводит к получению смеси *транс*-изомера (соединения I) с хорошим выходом и
15 высоким диастереомерным избытком и меньшего количества соответствующего 4-замещенного циклогексанона (соединения III). Авторам удалось разработать способ, который является значительно более эффективным, чем способы разделения, ранее являвшиеся частью традиционного способа производства.

Авторы впервые разработали биокаталитический способ получения сложных эфиров 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула I), в частности –
20 сложных C₁₋₆ алкиловых эфиров, предпочтительно – сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединение Ib) и сложного изопропилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединение Id), наиболее предпочтительно - сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-
25 аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединение Ib).

Это решение по настоящему изобретению означает новый применимый в промышленности альтернативный подход для получения гидрохлорида сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединение Ib·HCl), и поэтому дает значительный вклад в улучшение производства
30 Карипразина, поскольку гидрохлорид сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединение Ib·HCl) является ключевым интермедиатом (промежуточным продуктом) для получения Карипразина.

Когда катализируемое ТА восстановительное аминирование соответствующего сложного этилового эфира 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты было испытано в качестве диастереотопселективного способа прямого получения *транс*-продукта (соединение Ib), испытанные ТА дали продукт, содержащий преимущественно *цис*-форму (соединение IIb).

Первоначальная рабочая гипотеза авторов изобретения в отношении диастереомерселективного разделения *цис/транс*-изомерной смеси некоторых сложных C₁₋₆-алкиловых эфиров, предпочтительно – сложных этилового и изопропилового эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединения Ib+IIb и Id+IIId, соответственно), состояла в том, что с помощью *цис*-селективной ТА полученную смесь *цис/транс*-изомеров (соединения I+II) в соотношении, примерно равном 1:1, можно разделить биокаталитическим способом в присутствии субэквимольного количества акцептора аминогруппы кетонного типа.

Авторы неожиданно обнаружили, что являвшееся целью разделение изомерных сложных эфиров (соединения I+II) посредством применения биокаталитических способов с использованием ТА в присутствии пирувата как акцептора аминогруппы в субэквимольных количествах можно осуществить с превосходными результатами с получением до более 85% *транс*-изомера (соединение I) при диастереомерном избытке более 98% и менее 15% кетона (соединение III), и что способы, которые можно было осуществлять в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока, давали различные уровни изомеризации *цис*- в *транс*- (конверсия соединения II в соединение I), кроме дезаминирования *цис*-изомера (соединение II) с получением кетона (соединение III).

Для катализируемого одной ТА биокаталитического способа изомеризации *цис*- в *транс*-, начинающегося со сложного эфира *цис/транс*-2-(4-аминогексил)уксусной кислоты (соединения I+II), предпочтительно – смеси изомеров сложного этилового эфира (соединения Ib+IIb), в качестве соединения, являющегося акцептором аминогруппы, в субэквимольных количествах можно использовать сложные эфиры 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (III), предпочтительно – сложный этиловый эфир 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (соединение IIIb), что приводит к получению смеси *транс*-изомера (соединение Ib) с повышенным диастереомерным избытком (de_{trans} приблизительно 75-80%) и добавленного сложного этилового эфира 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (соединение IIIb) в количестве, близком к первоначальному. После выделения

транс-изомера (соединение Ib) из этой смеси посредством перекристаллизации смесь остаточной жидкости после перекристаллизации, содержащей *цис*-изомер (соединение IIb) и кетон, являющийся акцептором аминогруппы (соединение IIIb), можно прямо рециркулировать на следующую стадию изомеризации в качестве смеси акцептора аминогруппы и исходной диастереомерной смеси.

В целом, нестереоселективное восстановительное аминирование кетонов с различными функциональными группами, например – ароматическими, алифатическими и карбоксилатными группами, можно осуществить либо в периодическом режиме, либо в режиме непрерывного потока согласно способу, описанному в публикации P. Falus et al. (Tetrahedron Lett., 52, 1310-1312 (2011), DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.01.062).

Во время своей исследовательской работы авторы изобретения испытали сложный эфир 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (I), предпочтительно – сложный этиловый 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (IIIb) или сложный изопропиловый эфир 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (IIIc), наиболее предпочтительно – сложный этиловый эфир 2-(4-оксициклогексил)уксусной кислоты (соединение IIIb), в качестве акцептора аминогруппы в процессе биокаталитической *цис*- в *транс*-изомеризации (соединения II в соединение I).

Шесть трансаминазных ферментов с различными энантиомерными предпочтениями, которые уже успешно применяли для кинетического разделения рацемических аминов в иммобилизованной цельноклеточной форме, как раскрыто в публикации Z. Molnár et al. (Catalysts, 9, 438 (2019), DOI: 10.3390/catal9050438), были выбраны для стереоселективных способов. Выбранные ТА включали три (*R*)- и три (*S*)-селективные ТА, (*R*)-селективные ТА – из *Arthrobacter* sp. (*ArR*-ТА), ее мутированный вариант (*ArR_{mut}*-ТА), ТА из *Aspergillus terreus* (*AtR*-ТА); и (*S*)-селективные ТА из *Arthrobacter citreus* (*ArS*-ТА), мутированный вариант из *Chromobacterium violaceum* (*CvS_{W60C}*-ТА), ТА из *Vibrio fluvialis* (*VfS*-ТА), соответственно.

Циклогексаноны, замещенные алкоксикарбонилметильными группами в положении 4 (формула III) преобразовывали в периодическом режиме с использованием шести (*R*)- или (*S*)-селективных трансаминаз до диастереомеров соответствующего алкил-2-(4-аминоциклогексил)ацетата (формула I или формула II). Опыты, начинавшиеся от этил-2-(4-оксициклогексил)ацетата (соединение IIIb), выявили наивысшую диастереотопную селективность с преимущественным

образованием *цис*-диастереомера (соединение IIb, $de_{cis} > 90\%$) у ТА из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-ТА) [К. Е. Cassimje et al. (Org. Biomol. Chem., 10, 5466-5470 (2012), DOI: 10.1039/C2OB25893E)] и *Vibrio fluvalis* (VfS-ТА) [F. G. Mutti et al. (Eur. J. Org. Chem., 1003–1007 (2012), DOI: 10.1002/ejoc.201101476).

5 Соответственно, *цис*-селективные ТА включают, но не ограничены этим, мутированный вариант W60C ТА из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-ТА) и ТА из *Vibrio fluvalis* (VfS-ТА), отличающиеся своими аминокислотными последовательностями. Последовательность аминокислот CvS_{W60C}-ТА (SEQ ID NO: 1) представлена на Фиг. 1; последовательность аминокислот VfS-ТА (SEQ ID NO: 2) представлена на Фиг. 2. Парное сопоставление последовательностей для CvS_{W60C}-ТА и VfS-ТА представлено на Фиг. 3. Подчеркнутые аминокислоты в примерах последовательностей, показанных на Фиг. 1 и Фиг. 2, кодируют аффинные метки, поэтому они не включены в сравнение последовательностей.

15 Поскольку две последовательности аминокислот примеров ТА с *цис*-селективностью (SEQ ID NO: 1 для CvS_{W60C}-ТА и SEQ ID NO: 2 для VfS-ТА, изображенные на Фиг. 1 и Фиг. 2, соответственно) демонстрируют идентичность последовательностей, равную 37,1% (см. Фиг. 3), то предполагается, что любые ТА с более чем 40%-ной идентичностью последовательностям SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 будут иметь сходные каталитические свойства.

20 Изобретение обеспечивает способ динамической изомеризации для преобразования *цис*-4-замещенного циклогексан-1-амина (характеризующегося формулой С) в соответствующий *транс*-4-замещенный циклогексан-1-амин (характеризующийся формулой Т) с использованием одной трансаминазы, содержащей последовательность аминокислот с по меньшей мере 37%-ной, 40%-ной, 50%-ной, 55%-ной, 60%-ной, 70%-ной, 75%-ной, 80%-ной, 85%-ной, 90%-ной, 91%-ной, 92%-ной, 93%-ной, 94%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной, 99%-ной и более идентичностью последовательности любому из примеров последовательностей по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 1 для CvS_{W60C}-ТА или SEQ ID NO: 2 для VfS-ТА) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот, причем идентичность последовательностей определяют посредством анализа с использованием алгоритма сравнения последовательностей или посредством визуальной оценки относительно последовательности аминокислот по настоящему изобретению.

Согласно экспериментальным результатам авторов изобретения, катализируемую ТА реакцию, имеющую целью диастереомерселективное кинетическое разделение *цис/транс*-изомерной смеси некоторых C₁₋₆-алкильных сложных эфиров (I+II), предпочтительно – сложных этилового и изопропилового эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (Ib+IIb и Id+IIд, соответственно) с помощью одной *цис*-селективной ТА в присутствии субэквимольного количества акцептора аминогруппы кетонного типа, можно осуществить с получением *транс*-изомерного продукта (соединение I) с высокой диастереомерной чистотой (de_{trans}) и с выходами, значительно превышающими содержание (X_{trans}) *транс*-изомера (соединение I) в исходной *цис/транс*-изомерной смеси (соединения I+II). Поэтому способ по настоящему изобретению является не простым диастереомерселективным кинетическим разделением *цис/транс*-изомерной смеси (соединения I+II), а способом динамической изомеризации, преобразующим значительную долю побочного продукта – *цис*-изомера (соединение II) - в желаемый *транс*-изомерный продукт (соединение I).

Безотносительно к какой-либо базовой научной теории, относящейся к настоящему изобретению, объяснением происходящего химического процесса может быть то, что в присутствии акцептора аминогруппы в субэквимольных количествах преобразование *цис*-изомер (соединение II) ↔ кетон (соединение III) является более благоприятным кинетически (относительно быстрым в обоих направлениях и поэтому обратимым), тогда как преобразование кетон (соединение III) ↔ *транс*-изомер (соединение I) является гораздо более медленным, и его равновесие сдвинуто в сторону термодинамически благоприятного *транс*-изомера (соединение I).

Что касается первого аспекта настоящего изобретения, авторы попытались найти для практического применения биокаталитического способа на основе трансаминазы технологическое решение для диастереомерного разделения с использованием периодического способа.

При использовании пирувата натрия в качестве акцептора аминогруппы в субэквимольных количествах в способе динамической изомеризации, исходя из *транс/цис*-амин (соединения Ib+IIb в соотношении, примерно равном 1:1, 25мМ), можно достичь высокого диастереомерного избытка *транс*-изомерного продукта (соединение Ib: $de_{trans} > 95\%$) при использовании обеих трансаминаз – из *Chromobacterium violaceum* и *Vibrio fluvialis* (CvS_{W60C}-ТА и Vfs-ТА, соответственно)

при различных длительностях реакции, зависящих от композиции ТА-биокатализатора и его количества (Таблица 1).

Таблица 1

Пример	ТА биокатализатор (количество)	Время (ч)	de_{trans} (%)	x_{trans} (%)	x_{cis} (%)	x_{ketone} (%)
Пример 1	CvS-TA иммобил. цельнокл. (25 мг/мл)	0	12,0	56,0	44,0	0,0
		24	98,3	76,3	0,6	23,0
Пример 2	VfS-TA иммобил. цельнокл. (25 мг/мл)	0	12,0	56,0	44,0	0,0
		24	96,0	70,6	1,5	27,9
Пример 3	VfS-TA иммобил. цельнокл. (50 мг/мл)	0	12,0	56,0	44,0	0,0
		6	97,3	74,5	1,0	24,5
Пример 4	CvS-TA очищенная (0,5 мг/мл)	0	12,0	56,0	44,0	0,0
		2	99,9	86,0	0,0	14,0
Пример 5	VfS-TA очищенная (0,5 мг/мл)	0	~0	49,0	51,0	0,0
		3	98,7	79,0	0,5	20,5
Пример 6	VfS-TA ковалентно иммобил. (5 мг/мл)	0	~0	49,0	51,0	0,0
		6	95,9	74,9	1,6	23,6

Здесь и далее «~» в таблицах означает «приблизительно».

- 5 Пример 4 в Таблице 1 демонстрирует наилучший протокол с очищенной растворимой CvS_{W60C}-ТА, начинающийся со смеси *транс*-изомера (соединение Ib, $x_{trans}=56\%$) и *цис*-изомера (соединение IIb, $x_{cis}=44\%$), давший после 2 часов реакции хороший выход *транс*-изомера (соединение Ib; $x_{trans}=86\%$) с $de_{trans}>99\%$ и меньшее количество кетона (соединение IIIb: $x_{ketone}=14\%$) при периодическом режиме.
- 10 результат демонстрирует, что до 68% исходного содержания *цис*-изомера (соединения IIb) можно преобразовать в желаемый *транс*-изомер (соединение Ib).

- Примеры, представленные в Таблице и на Фиг. 1 демонстрируют, что значительный уровень *цис*- в *транс*-изомеризации [преобразование от 34% до 68% исходного *цис*-содержания (соединения IIb) в желаемый *транс*-изомер (соединение
- 15 Ib) можно получить при использовании либо различных форм CvS_{W60C}-ТА (Примеры 1 и 4), либо различных препаратов VfS-TA (Примеры 2, 3, 5 и 6).

Примеры, приведенные в Таблице 1, также показывают, что *цис*-селективные ТА можно использовать в качестве биокатализаторов в их очищенных растворимых формах (Примеры 4 и 5) или в иммобилизованных формах, таких как экспрессирующие ТА цельные клетки, иммобилизованные посредством золь-гель захвата (согласно способу Z. Molnár et al., Catalysts, 9, 438 (2019), DOI: 10.3390/catal9050438) (Примеры 1, 2 и 3), или очищенные белки, ковалентно присоединенные к пористой полимерной смоле (согласно способу E. Abaházi, et al., Biochem. Eng. J. 132, 270-278 (2018), DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.022) (Пример 6).

Если начинать с *транс/цис*-амин (соединения Ib+IIb в соотношении, примерно равном 1:1, 25 мМ) и использовать 4-замещенный циклогексанон (соединение IIIb) или циклогексанон в качестве акцептора аминогруппы, то по истечении различных периодов реакции можно достигнуть термодинамического равновесия ($de_{trans} > 75-80\%$), в зависимости от формы и количества ТА биокатализатора (Таблица 2).

15

Таблица 2

Пример	ТА биокатализатор, количество (донор аминогруппы, количество)	Время (ч)	de_{trans} (%)	X_{trans} (%)	X_{cis} (%)	X_{ketone} (%)
Пример 7	VfS-ТА иммобил. цельноклет., 50 мг/мл	0	13,6	51,5	39,2	11,0
	(0,1 экв, IIIb)	48	71,5	74,6	12,4	13,0
Пример 8	VfS-ТА очищенная, 0,5 мг/мл	0	~0	44,4	46,2	11,0
	(0,1 экв, IIIb)	48	75,7	78,4	10,8	10,7
Пример 9	VfS-ТА очищенная, 0,5 мг/мл	0	~0	49,0	51,0	0,0
	(0,2 экв. циклогексанона)	48	80,4	85,9	9,3	4,8

Пример 7 в Таблице 2 показывает, что при использовании иммобилизованной цельноклеточной формы VfS-ТА и соответствующего 4-замещенного циклогексанона (соединение IIIb: $X_{ketone}=11\%$) в качестве акцептора аминогруппы способ динамической изомеризации, начинающийся от *транс/цис*-диастереомерной смеси (соединение Ib и соединение IIb, в соотношении 51,5:39,2), может дать, кроме почти исходного количества кетона (соединение IIIb: $X_{ketone}=13,0\%$), значительно увеличенное количество *транс*-изомера (соединение Ib:

20

$x_{trans}=74,6\%$ при $de_{trans}=71,5\%$) после 48-часового времени реакции в периодическом режиме. Эти данные означают, что с помощью иммобилизованного VfS-TA биокатализатора приблизительно 53% исходного содержания *цис*-изомера (соединения IIb) можно преобразовать в желаемый *транс*-изомер (соединение Ib).

5 *Транс/цис*-разделение способом, аналогичным раскрытому в WO2010/070368, может привести к получению смеси в остаточном растворе, содержащей почти идентичные количества *цис*-изомера (соединения IIb) и кетона (соединение IIIb), которую можно рециркулировать в качестве смеси акцептора аминогруппы/*цис*-изомера в следующий цикл динамической изомеризации.

10 Пример 8 в Таблице 2 показывает, что с использованием очищенной растворимой VfS-TA и соответствующего 4-замещенного циклогексанона (соединение IIIb: $x_{ketone}=11,0\%$) в качестве акцептора аминогруппы способ динамической изомеризации, начинающийся со смеси *транс*-изомера (соединение Ib, $x_{trans}=44,4\%$) и *цис*-изомера (соединение IIb, $x_{cis}=46,6\%$), может привести по
15 истечении 48-часового времени реакции к значительному увеличению количества *транс*-изомера (соединение Ib, $x_{trans}=78,4\%$) с небольшим количеством остаточного *цис*-изомера (соединение IIb, $x_{cis}=10,8\%$), что означает $de_{trans}=75,7\%$, совместно с исходным количеством кетона (соединение III: $x_{ketone}=10,7\%$) в периодическом режиме. Эти данные означают, что приблизительно 53% исходного содержания *цис*-
20 изомера (соединения IIb) можно преобразовать в желаемый *транс*-изомер (соединение Ib).

Пример 9 в Таблице 2 показывает, что при использовании очищенной растворимой VfS-TA и циклогексанона (в количестве, равном 0,2 экв.) в качестве акцептора аминогруппы способ динамической изомеризации, начинающийся от
25 смеси *транс*-изомера (соединение Ib, $x_{trans}=49\%$) и *цис*-изомера (соединение IIb, $x_{cis}=51\%$), может привести по истечении 48-часового времени реакции к наибольшему увеличению количества *транс*-изомера (соединение Ib, $x_{trans}=85,9\%$) с малым количеством остаточного *цис*-изомера (соединение IIb, $x_{cis}=9,3\%$), что означает $de_{trans}=75,7\%$ в периодическом режиме. Это значение de_{trans}
30 предположительно является близким к наивысшему достижимому термодинамическому равновесному отношению.

Что касается второго аспекта настоящего изобретения, то авторы попытались найти для практического применения биокаталитического способа на

основе трансаминазы технологическое решение для диастереомерного разделения с использованием режима непрерывного потока.

Применение проточной химии в методологиях синтеза постоянно растет (M. Giudi et al. *Chem. Soc. Rev.* 49, 8910-8932 (2020), DOI: 10.1039/c9cs00832b). Широкая
5 разносторонность применений обусловлена модульной природой подхода, обеспечивающей легкую интеграцию новых условий, оборудования, аналитики, автоматизации и типов реагентов как в одностадийные, так и в многостадийные способы. Точные результаты контроля с превосходной воспроизводимостью и надежностью делают проточную химию применимой в широком диапазоне
10 дисциплин, в том числе в синтезах для фармацевтической промышленности (M. Baumann et al. *Org. Proc. Res. Dev.* 24, 1802-1813 (2020), DOI: 10.1021/acs.oprd.9b00524; D. L. Hughes, *Org. Proc. Res. Dev.* 24, 1850-1860 (2020), DOI: 10.1021/acs.oprd.0c00156).

Преимущества синтетической химии в проточных системах можно
15 объединить с преимуществами биокатализа, включающими реакции при более экологических, мягких, низкотемпературных и водных условиях (J. Britton et al., *Chem. Soc. Rev.* 47, 5891–5918 (2018), DOI: 10.1039/c7cs00906b; P. De Santis et al., *React. Chem. Eng.* 5, 2155–2184 (2020), DOI: 10.1039/d0re00335b). Кроме точного контроля условий реакции, использование проточной системы может облегчить проблемы
20 ферментативного катализа, такие как ингибирование субстратом и продуктом. Реакции с использованием клеток и ферментов могут обеспечить преимущество значительного улучшения смешивания, массопереноса, терморегуляции, осуществимости реакций под давлением, автоматизации и сниженной
25 вариабельности способа в проточной системе, а также анализа продукта и очистки, которые облегчает непрерывный поток. Поэтому сочетание непрерывного потока и биокатализа приобрело известность в качестве высокоэффективного подхода для достижения различных целей химического синтеза.

Критерии выбора из трех идеальных типов реакторов, а именно – резервуарного реактора периодического действия с перемешиванием (BSTR; от
30 англ.: batch stirred tank reactor), для биокатализа проанализированы в публикациях J. M. Woodley (Woodley, J.M. Chapter 3.9. in “Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis”, K. Faber, W. D. Fessner, N. J. Turner, Eds.; Thieme: Stuttgart (2015), Volume 3, pp. 515–546, DOI: DOI: 10.1055/sos-SD-216-00331) и R. Lindeque et al. (*Catalysts* 9, 262 (2019); DOI: 10.3390/catal9030262).

BSTR часто используют для биокаталитических реакций из-за их простоты и гибкости. В случае BSTR вначале субстрат и фермент загружают в бак с механическим перемешиванием для начала реакции, после чего материал не удаляют до завершения реакции. В BSTR концентрации являются одинаковыми, независимо от положения внутри реактора. Вначале субстрат потребляется быстро, тогда как по мере протекания реакции скорость реакции замедляется. Однако, если задать достаточное время реакции в BSTR, можно достичь полной конверсии при условии благоприятного равновесия

Конструкция реактора резервуарного типа с непрерывным перемешиванием (CSTR; от англ.: continuously stirred tank reactor) сходна с конструкцией BSTR, за исключением того, что материал постоянно добавляют и извлекают, так что рабочий объем остается постоянным. В CSTR биокатализатор либо непрерывно подают в реактор, чтобы компенсировать потерю катализатора с вытекающей жидкостью, либо его удерживают в реакторе посредством иммобилизации и/или с помощью частично проницаемых мембран. Поскольку в CSTR обеспечено хорошее перемешивание, содержимое реактора и вытекающая жидкость являются гомогенными. Однако в CSTR вытекающая жидкость всегда содержит некоторое количество субстрата, и поэтому полное преобразование субстрата невозможно. Этот компромисс между скоростью реакции и конверсией является важной характеристикой CSTR.

В поршневом проточном реакторе (CPFR; от англ.: continuous plug flow reactor) реагенты закачивают в длинный трубчатый реактор, где, в отличие от резервуаров с перемешиванием, материал, текущий по трубе, не смешивается с материалом, текущим перед ним или после него. Это приводит к образованию градиентов концентрации по длине реактора, идентичных градиентам концентрации во времени в BSTR. Поэтому, если реактор достаточно длинный, субстрат может быть полностью преобразован. По этой причине время, которое материал проводит в CPFR, просто является функцией длины реактора и объемной скорости потока. Хотя возможно эксплуатировать CPFR с растворимым катализатором, в характерном случае биокатализаторы иммобилизованы на стенке реактора или на частицах материала-носителя, которые затем упаковывают в трубу с получением реактора непрерывного действия с уплотненным слоем наполнителя (CPBR; от англ.: continuous packed bed reactor).

Когда авторы задались целью получать *транс*-изомер (формула I) в режиме непрерывного потока, авторы выполнили эксперименты, направленные на динамическую изомеризацию, позволяющую получить сложный эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула I) из *транс/цис*-изомерной смеси (формула I + формула II), катализируемую ТА в CPFR. Применимость препаратов ТА в реакторах с уплотненным слоем наполнителя при способе с непрерывным потоком зависит от физико-химических свойств иммобилизованной ТА, таких как плотность фермента и его доступность на поверхности, форма и размер частиц носителя. Различные способы иммобилизации ТА можно использовать для катализируемых ТА способов кинетического разделения в режиме непрерывного потока. CvS_{W60C} -ТА и VfS -ТА можно использовать в форме иммобилизованных цельноклеточных биокатализаторов согласно способу Z. Molnár et al. (Catalysts, 9, 438 (2019), DOI: 10.3390/catal9050438), также можно использовать CvS_{W60C} -ТА, ковалентно иммобилизованную на макропористой полимерной смоле, как описано E. Abaházi, et al. (Biochem. Eng. J. 132, 270-278 (2018), DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.022).

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, диастереомерные смеси сложных этилового или изопропилового эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (Ib+IIb или Id+IIId, соответственно) изомеризовали в присутствии субэквимолярного количества пирувата как акцептора аминогруппы через образование кетонного интермедиата (соединение III) с получением смеси высокодиастереоочистого *транс*-амин (I, с $de_{trans} >99\%$) и кетона (соединение III) в присутствии соответствующих *цис*-селективных трансаминаз (например, ТА из *Chromobacterium violaceum* или ТА из *Vibrio fluvialis*).

Согласно результатам экспериментов авторов изобретения с динамической изомеризацией, в частности, предпочтительной оказалась иммобилизованная форма *цис*-селективной ТА, более конкретно – предпочтительными были CvS_{W60C} -ТА и VfS -ТА, и особо предпочтительным было использование CvS_{W60C} -ТА, ковалентно иммобилизованной на макропористой полимерной смоле (CvS_{W60C} -ТА_{СВ}). Способ динамической изомеризации, начинающийся с раствора *транс/цис*-амин (соединения Ib+IIb или Id+IIId в соотношении, близком к 1:1, 20 мМ) и пирувата натрия в качестве акцептора аминогруппы (0,95 экв.), при объемной скорости, равной 10 мкл·мин⁻¹, в соединенных последовательно колонках с уплотненным слоем, заполненных CvS_{W60C} -ТА_{СВ} (приблизительно 220 мг), привел к превосходном

диастереомерному избытку *транс*-продукта (соединение Ib или Id: $de_{trans} >99\%$) (Таблица 3).

Таблица 3

Пример	Колонки с CvS_{W60C} -ТА _{СВ} (число)	Время (ч)	de_{trans} (%)	X_{trans} (%)	X_{cis} (%)	X_{ketone} (%)
Пример 10	3	0		30,3	69,7	0,0
		48	>99	38,8	0	61,2
Пример 11	4	0		48,3	51,7	0,0
		48	>99	54,0	0	46,0

5 Пример 10 в Таблице 3 показывает, что при использовании CvS_{W60C} -ТА, ковалентно иммобилизованной на макропористой полимерной смоле, и пирувата натрия (0,95 экв.) в качестве акцептора аминогруппы способ динамической изомеризации, начинающийся от *транс/цис*-диастереомерной смеси сложных этиловых эфиров в форме HCl соли (соединения Ib·HCl и IIb·HCl в соотношении 10 30,3:69,7) можно осуществить в режиме непрерывного потока. Неоптимизированный способ дал, кроме кетонного интермедиата (соединение IIIb: $X_{ketone}=61,2\%$), увеличенное количество *транс*-изомера (соединение Ib: X_{trans} 38,8% с $de_{trans} >99$) после 48 часов непрерывной работы. Эти данные означают, что с помощью иммобилизованного CvS_{W60C} -ТА биокатализатора исходное содержание *транс*- 15 изомера (соединение Ib), равное 30,3%, увеличилось на 8,5% до 38,8%, обеспечив фактический выход желаемого *транс*-изомера в форме HCl соли (соединение Ib·HCl), равный 30,7%.

Пример 11 в Таблице 3 демонстрирует, что ковалентно иммобилизованный CvS_{W60C} -ТА биокатализатор в присутствии пирувата натрия (0,95 экв.) в качестве 20 рецептора аминогруппы можно использовать для динамической изомеризации *транс/цис*-диастереомерной смеси сложных изопропиловых эфиров в форме их соли с HCl (соединения Id·HCl и IIId·HCl в соотношении 48,3:51,7) в режиме непрерывного потока. Неоптимизированный способ дал, кроме кетонного интермедиата (соединение IIIId: $X_{ketone}=46,0\%$), увеличенное количество *транс*- 25 изомера (соединение Id: X_{trans} 54,0% с $de_{trans} >99$) после 48 часов непрерывной работы. Эти результаты показывают, что с помощью иммобилизованного CvS_{W60C} -ТА биокатализатора исходное содержание *транс*-изомера (соединение Id), равное

48,3%, увеличилось на 5,7% до 54,0%, обеспечив фактический выход желаемого *транс*-изомера в форме соли с HCl (соединение Id·HCl), равный 46,5%.

Согласно экспериментальным результатам, суммированным в Таблице 4, частичную динамическую изомеризацию с использованием иммобилизованной формы *цис*-селективной ТА можно осуществить на основе последующего выбора *цис/транс*-диастереомерных смесей 4-замещенных циклогексиламинов (соединение С + соединение Т) в режиме непрерывного потока. Способ динамической изомеризации, начатый с раствора *транс/цис*-амина (соединения С+Т) и пирувата натрия как акцептора аминогруппы (0,95 экв.), при объемной скорости, равной 10 мкл·мин⁻¹, в последовательно соединенных колонках с уплотненным слоем катализатора, заполненных CvS_{W60C}-ТА_{СВ} (приблизительно 220 мг), при 40°C привел к превосходному диастереомерному избытку *транс*-продукта (соединение Ib или Id: $d e_{trans} >99$) (Таблица 4).

Таблица 4

Пример	Субстрат, количество (Число колонок с CvS _{W60C} -ТА _{СВ})	Время (ч)	$d e_{trans}$ (%)	X_{trans} (ВЫХОД) (%)	X_{cis} (%)	X_{ketone} (%)
Пример 12	С+Т (G= H), 20 мМ	0		58,0	42,0	0,0
	4	24	>99	80,2 (-)	0	19,8
Пример 13	С+Т (G= Me), 20 мМ	0		34,6	65,4	0,0
	2	24	>99	46,2 (30,4)	0	53,8
Пример 14	С+Т (G= Ph), 15 мМ	0		73,8	26,2	0,0
	2	24	>99	83,2 (77,7)	0	16,8
Пример 15	С+Т (G= CH ₂ Ph), 15 мМ	0		49,3	50,7	0,0
	1	24	>99	59,8 (54,1)	0	40,2

15

Пример 12 в Таблице 4 показывает, что, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-метилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·HCl + Т·HCl (G=H) в соотношении 42:58), можно осуществить способ динамической изомеризации с иммобилизованным CvS_{W60C}-ТА биокатализатором в присутствии пирувата натрия (0,95 экв.) в качестве акцептора аминогруппы в режиме непрерывного потока. Неоптимизированный способ дал, кроме кетонного

20

интермедиата (соединение К (G=H): $x_{\text{ketone}}=19,8\%$), увеличенное количество *транс*-изомера (соединение Т (G=H): $x_{\text{trans}} 80,2\%$ с $de_{\text{trans}} >99$) после 24 часов непрерывной работы. Эти данные показывают, что исходное содержание *транс*-изомера (соединение Т (G=H)), равное 58,0%, увеличилось на 22,2% до 80,2%. Из-за его
5 летучести продукт (соединение Т (G=H)) не был выделен.

Пример 13 в Таблице 4 демонстрирует, что ковалентно иммобилизованный CvS_{W60C}-ТА биокатализатор в присутствии пирувата натрия (0,95 экв.) в качестве акцептора аминогруппы можно использовать для динамической изомеризации *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-этилциклогексан-1-аминия хлорида
10 (соединения С·HCl + Т·HCl (G=Me) в соотношении 65,4:34,6) в режиме непрерывного потока. Неоптимизированный способ дал, кроме кетонного интермедиата (соединение С+Т (G=Me): $x_{\text{ketone}}=53,8\%$), увеличенное количество *транс*-изомера (соединение Т (G=Me): $x_{\text{trans}} 46,2\%$ с $de_{\text{trans}} >99$) после 24 часов непрерывной работы. Эти результаты показывают, что исходное содержание *транс*-изомера (соединение
15 Т (G=Me)), равное 34,6%, увеличилось на 11,6% до 46,2%, обеспечив фактический выход желаемого *транс*-изомера в форме соли с HCl (соединение Т·HCl (G=Me)), равный 30,4%.

Пример 14 в Таблице 4 показывает, что при использовании иммобилизованного на смоле CvS_{W60C}-ТА биокатализатора и пирувата натрия (в
20 количестве, равном 0,95 экв.) в качестве акцептора аминогруппы неоптимизированный способ динамической изомеризации, начинающийся с *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-фенилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·HCl + Т·HCl (G=Ph) в соотношении 26,2:73,8) в режиме непрерывного потока может дать после реакции в течение 24 часов наибольшее количество
25 *транс*-изомера (соединение Т (G=Ph): $x_{\text{trans}}=83,2\%$), обеспечив фактический выход, равный 77,7%, требуемого *транс*-изомера в форме соли с HCl (соединение Т·HCl (G=Ph)).

Пример 15 в Таблице 4 подтверждает, что способ динамической изомеризации с использованием иммобилизованного CvS_{W60C}-ТА биокатализатора в
30 присутствии пирувата натрия (0,95 экв.) в качестве рецептора аминогруппы, начинающийся от *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-бензилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·HCl + Т·HCl (G=CH₂Ph) в соотношении 50,7:49,3) можно осуществить в режиме непрерывного потока. Неоптимизированный способ дал, кроме кетонного интермедиата (соединение К (G=CH₂Ph): $x_{\text{ketone}}=40,2\%$),

увеличенное количество *транс*-изомера (соединение Т (G=CH₂Ph): x_{trans} 59,8% с $de_{trans} >99$) после 24 часов непрерывной работы. Эти данные показывают, что исходное содержание *транс*-изомера (соединение Т (G= CH₂Ph)), равное 58,0%, увеличилось на 10,5% до 59,8%, обеспечив фактический выход желаемого *транс*-изомера в форме соли с HCl (соединение Т·HCl (G= CH₂Ph)), равный 54,1%.

Резюмируя все вышесказанное, все эксперименты, приведенные в Таблицах 1-4, показали, что динамическую изомеризацию *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-замещенного циклогексан-1-амин (соединения С+Т) или его соли (соединения С·HCl + Т·HCl) в *транс*-диастереомер (соединения Т) можно выполнить с различными формами *цис*-селективной ТА в присутствии субэквимольного количества кетона, являющегося акцептором аминогруппы, в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока. Во всех случаях количество *транс*-изомера (Т) в полученной смеси значительно больше, чем в исходной *цис/транс*-диастереомерной смеси (С+Т), что показывает потенциал способа динамической изомеризации в отношении увеличения препаративного выхода *транс*-изомера (Т) по сравнению с любым стандартным способом, основанным на разделении диастереомеров без изомеризации.

На основании экспериментальных результатов, суммированных в Таблицах 1-4, можно предположить, что частичную динамическую изомеризацию с помощью *цис*-селективной ТА можно успешно осуществить, выбрав *цис/транс*-диастереомерные смеси других 4-замещенных циклогексиламинов, таких как 4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амины (формула (IVa) + формула (Va)) и 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амины (формула (VIIa) + формула (VIIIa)).

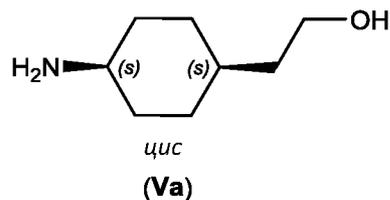
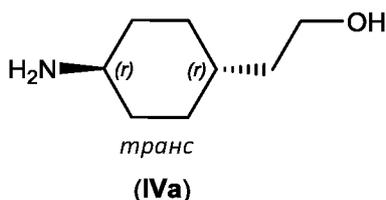
Соответственно, ожидается, что с использованием очищенной растворимой CvS_{W60C}-ТА, исходя из диастереомерной смеси *транс/цис*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-аминов (соединение IVa + соединение Va), в присутствии субэквимольного количества пирувата натрия можно получить *транс*-изомер (соединение IVa) после времени реакции, равного нескольким часам, с хорошим выходом (превосходящим исходное количество *транс*-изомера (соединение IVa)) с высокой диастереомерной чистотой ($de_{trans} >90\%$) и умеренное или небольшое количество кетона (соединение VIa) в периодическом режиме. Также предполагается, что с использованием иммобилизованной CvS_{W60C}-ТА и субэквимольного количества кетона в качестве акцептора аминогруппы также можно получить *транс*-изомер (соединение IVa) из *транс/цис*-диастереомерной

смеси 4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-аминов (соединение IVa + соединение Va) с высоким диастереомерным избытком ($de_{trans} >95\%$) и умеренное количество кетона (соединение VIa) в режиме непрерывного потока. Ожидается, что большое количество исходного *цис*-изомера (соединение Va) можно будет преобразовать в желаемый *транс*-изомер (соединение IVa) в этих способах динамической изомеризации.

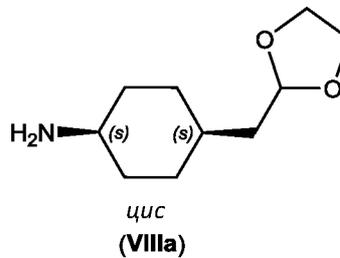
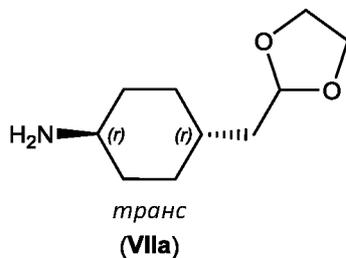
Также ожидается, что динамическая изомеризация *транс/цис*-диастереомерной смеси 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминов (соединение VIIa + соединение VIIIa) с использованием очищенной растворимой CvS_{W60C}-ТА может привести по истечении времени реакции, равного нескольким часам, к значительно увеличенному количеству *транс*-изомера (соединение VIIa) с высоким диастереомерным избытком ($de_{trans} >90\%$) совместно с малым количеством кетона (соединение IXa) в периодическом режиме. Также предполагается, что с использованием иммобилизованной CvS_{W60C}-ТА и субэквимольного количества кетона, являющегося акцептором аминогруппы, *транс*-изомер (соединение VIIa) также можно получить из *транс/цис*-диастереомерной смеси 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминов (соединение VIIa + соединение VIIIa) с высоким диастереомерным избытком ($de_{trans} >95\%$) совместно с малым количеством кетона (соединение VIa) в режиме непрерывного потока. Предполагается, что значительное количество исходного *цис*-изомера (соединение VIIIa) можно будет преобразовать в желаемый *транс*-изомер (соединение VIIa) в этих способах динамической изомеризации.

Таким образом, авторы впервые разработали биокаталитический путь динамической изомеризации, приводящей к получению сложных алкиловых эфиров 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формулы Ia-Ic), в частности – к сложному этиловому эфиру 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib) или к сложному изопропиловому эфиру 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Id), наиболее предпочтительно – к сложному этиловому эфиру 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib), в качестве ключевых интермедиатов синтеза Карипразина. Это означает альтернативный и применимый в промышленности подход к получению гидрохлорида сложного этилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib·HCl), вместо перекристаллизации.

Сходным образом, *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амин формулы (IVa) также можно получить из *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-аминов (формула (IVa) + формула (Va)) с использованием одного трансаминазного биокатализатора в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольных до эквимольных, в периодическом режиме.



Наконец, катализируемая одной трансаминазой динамическая изомеризация обеспечивает конверсию *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминов (формула (VIIa) + формула (VIIIa)) в *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин формулы (VIIa) с использованием трансаминазного биокатализатора в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольных до эквимольных, в периодическом режиме



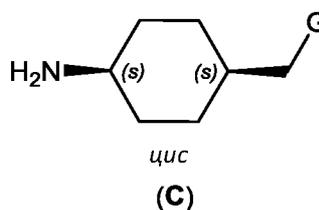
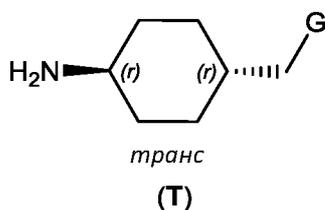
В целом, способ по настоящему изобретению обладает несколькими достоинствами и преимуществами.

Способ по настоящему изобретению

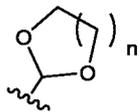
- обеспечивает возможность преимущественного преобразования большой доли побочного *цис*-продукта (формула С, в частности – формулы II, V или VIII);
- является значительно более эффективным, чем способы разделения, которые были частью традиционных способов производства,

- может быть осуществлен не только в периодическом режиме, но и в режиме непрерывного потока,
- разработан в лабораторном масштабе (менее грамма), но применим в промышленности, разработанную процедуру можно масштабировать,
- 5 – может быть осуществлен с использованием нативного фермента,
- требует только одной трансаминазы, тогда как в литературе по динамическому разделению/преобразованию энантиомеров преимущественно используют две ТА,
- обеспечивает значительное преимущество в отношении эффективности при использовании 4-замещенного циклогексанона (формула К) в качестве акцептора аминогруппы в способе, осуществляемом с использованием смеси *цис/транс*-амин (формулы С+Т), поскольку нет необходимости добавлять другие вещества, кроме кетонного интермедиата (формула К, в частности – формулы III, VI или IX),
- 10 – также может открыть новые возможности в период производства дженериков Карипразина,
- динамическая изомеризация, катализируемая одной трансаминазой, является применимой для синтеза других *транс*-4-замещенных циклогексиламинов, таких как *транс*-4-(2-гидроксиэтил)циклогексан-1-амин формулы (IVa) или *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин формулы (VIIa), которые могут служить альтернативными интермедиатами для получения Карипразина.
- 20

Исходя из подробностей и результатов, описанных выше, в целом, настоящее изобретение относится к способу получения (1*r*,4*r*)-4-замещенного циклогексан-1-амин [также обозначаемого как *транс*-4-замещенный циклогексан-1-амин] формулы (Т), исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (С) + формула (Т))



или любой их соли, причем в формуле (Т) и в формуле (С) G обозначает заместитель, выбранный из

- атома водорода;
- C₁₋₆ алкильной группы;
- 5 – сложноэфирного фрагмента (-COOR), где R представляет собой подходящую алкильную, аралкильную или арильную группу, предпочтительно – C₁₋₆ алкильную группу, более предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп;
- группы CH₂-OR', где R' представляет собой атом водорода или защитную
- 10 группу для гидроксила;
- защищенной альдегидной группы формулы , где n является целым числом от 1 до 2;
- замещенной или незамещенной арильной группы, предпочтительно – фенильной группы; или
- 15 – аралкильной группы, предпочтительно – бензильной группы,

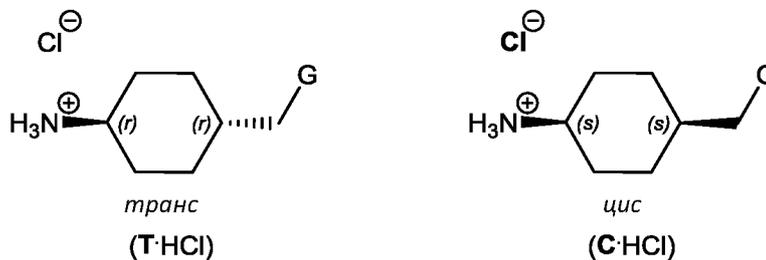
таким образом, что диастереомерная смесь реагирует с одним трансаминазным биокатализатором в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольного до эквимольного.

- 20 Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения этот общий способ получения может быть осуществлен в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока.

- 25 Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения этот общий способ получения может быть осуществлен, исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (С) + формула (Т)) в форме свободного основания.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения этот общий способ получения может быть осуществлен, исходя из

диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (C) + формула (T)) в форме соли, предпочтительно – в форме гидрохлоридной соли (формула (C·HCl) + формула (T·HCl)).



5 Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения этот общий способ получения может быть осуществлен, исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (C) + формула (T)) или их солей, содержащей *цис/транс*-изомеры в соотношении от примерно 2:98 до примерно 99:1.

10 Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 37%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) из *Chromobacterium violaceum* или трансаминазы из *Vibrio fluvialis*
 15 (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 40%-
 20 ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) из *Chromobacterium violaceum* или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 50%-
 25 ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) из *Chromobacterium violaceum* или трансаминазы из *Vibrio fluvialis*

(VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

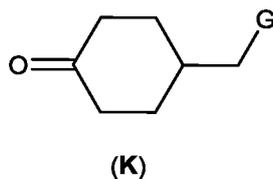
5 Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 60%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) из *Chromobacterium violaceum* или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

10 Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 75%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) из *Chromobacterium violaceum* или трансаминазы из *Vibrio fluvialis*
15 (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

20 Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 90%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) из *Chromobacterium violaceum* или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

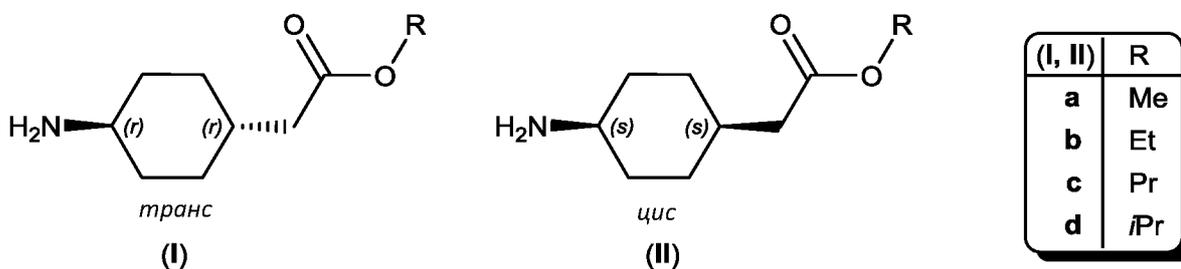
25 Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения используют подходящий кетон или альдегид в качестве соединения, являющегося акцептором аминокислотной группы, в субэквимольных количествах.

30 Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в этом общем способе получения в качестве кетона, являющегося акцептором аминокислотной группы, используют 4-замещенный циклогексанон формулы К



где G описан в пункте 1 формулы изобретения для формулы (С) и формулы (Т).

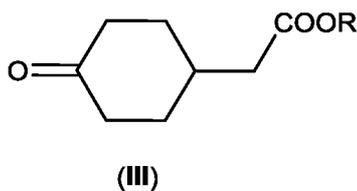
Что касается первого аспекта настоящего изобретения, то настоящее изобретение относится к способу, в котором исходная диастереомерная смесь состоит из сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты формулы (I) и формулы (II)



где R представляет собой подходящую алкильную, аралкильную или арильную группу, предпочтительно – C₁₋₆-алкильную группу, более предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп, в форме свободного основания или в форме соли.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют пируват натрия в субэквимольных количествах.

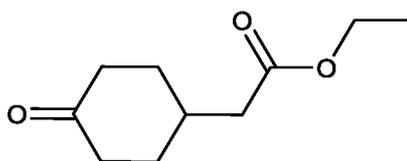
Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют 4-замещенный циклогексанон формулы (III)



в которой R представляет собой такую же подходящую алкильную, аралкильную или арильную группу, предпочтительно – такую же C₁₋₆-алкильную группу, более

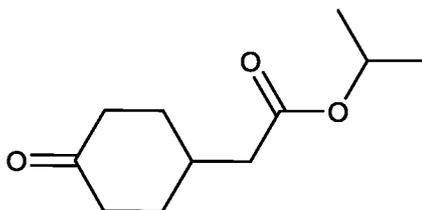
предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп, как определено для формул (I) и (II).

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют
5 этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат формулы (IIIb)



(IIIb)

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют
10 изопропил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат формулы (IIId)



(IIId)

10

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве трансаминазы в периодическом режиме используют мутантный (W60C) фермент из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 1/.

15 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 1/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

20 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве трансаминазы в периодическом режиме используют фермент из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 2/.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения трансаминазу из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 2/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ используют в режиме непрерывного потока.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения используют *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ с ковалентной иммобилизацией на пористой полимерной основе.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, исходя из диастереомерной смеси гидрохлоридной соли сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib·HCl + формула IIb·HCl), получают чистый сложный этиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib).

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, исходя из диастереомерной смеси гидрохлоридной соли сложного изопропилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Id·HCl + формула IIId·HCl), получают чистый сложный изопропиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Id).

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, способ получения сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I), предпочтительно – сложного C₁₋₆-алкилового эфира, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложного эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II), предпочтительно – сложных C₁₋₆-алкиловых эфиров, либо в форме амина, являющегося свободным основанием, либо в форме амина, высвободившегося из гидрохлоридной соли, можно осуществить в периодическом режиме с использованием цельноклеточной, частично или полностью очищенной растворимой, или иммобилизованной формы *цис*-селективной трансаминазы (предпочтительно – мутантной W60C TA из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ или TA из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA/) или в

режиме непрерывного потока с использованием иммобилизованной формы тех же *цис*-селективных трансаминаз (CvS_{W60C} -ТА или VfS -ТА) в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в субэквимольярных количествах.

5 Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения продукт – сложный этиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib) - используют при производстве *транс*- N -{4-[2-[4-(2,3-дихлорфенил)пиперазин-1-ил]этил]циклогексил}- N' , N' -диметилмочевины, известной под названием Карипразин.

10 Согласно предпочтительному варианту первого аспекта настоящего изобретения, способ получения сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I), исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложного эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II)), либо в форме амина, являющегося свободным основанием, либо в форме амина, высвободившегося из гидрохлоридной соли, можно осуществить в периодическом
15 режиме с использованием цельноклеточной, частично или полностью очищенной растворимой, или иммобилизованной формы *цис*-селективной трансаминазы в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в субэквимольярных количествах.

20 Согласно конкретному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) можно осуществить, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложного эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II)), причем амин имеет форму свободного основания.

25 Согласно другому конкретному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) можно осуществить, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I+II), причем амин имеет форму, высвободившуюся из солевой формы, в частности – из формы гидрохлоридной соли.

30 Согласно другому конкретному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) можно осуществить с использованием цельноклеточной, частично или полностью очищенной растворимой или

иммобилизованной формы мутантной W60C TA из *Chromobacterium violaceum* / CvS_{W60C}-TA/.

Согласно другому конкретному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (I) можно осуществить с использованием 5 цельноклеточной, частично или полностью очищенной растворимой, или иммобилизованной формы TA из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA/.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного C₁₋₆-алкилового эфира 10 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты можно осуществить, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложных C₁₋₆-алкиловых эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, причем амин имеет форму свободного основания или форму, высвободившуюся из формы гидрохлоридной соли.

Согласно другому более предпочтительному варианту осуществления 15 первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного C₁₋₆-алкилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты можно осуществить, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложных C₁₋₆-алкиловых эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты, причем амин имеет форму свободного основания или форму, высвободившуюся из формы гидрохлоридной 20 соли, и при этом смесь *цис/транс*-изомеров предусмотрена в соотношении от примерно 2:98 до примерно 99:1.

Согласно другому более предпочтительному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного C₁₋₆-алкилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты можно 25 осуществить в присутствии подходящего кетона или альдегида в качестве акцептора аминогруппы, используемого в субэквимольных количествах.

Согласно другому более предпочтительному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения сложного C₁₋₆-алкилового эфира 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты можно 30 осуществить в присутствии пирувата натрия в качестве акцептора аминогруппы.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения *транс*-N-{4-[2-[4-(2,3-дихлорфенил)пиперазин-1-ил]этил]циклогексил}-N',N'-диметилмочевины, более

известной под названием Карипразин, можно осуществить, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib) с использованием либо амина в форме свободного основания, либо амина в форме, высвобождающейся из гидрохлоридной соли, причем смесь *цис/транс*-изомеров сложного эфира имеет их отношение от примерно 2:98 до примерно 99:1, с использованием цельноклеточной, частично или полностью очищенной растворимой или иммобилизованной формы *цис*-селективной трансаминазы и в присутствии сложного эфира 2-(4-оксоциклогексил)уксусной кислоты (формула III), наиболее предпочтительно – этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетата (формула IIIb) в качестве акцептора аминогруппы, используемого в субэквимольных количествах.

Согласно другому наиболее предпочтительному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения способ получения *транс-N*-{4-[2-[4-(2,3-дихлорфенил)пиперазин-1-ил]этил]циклогексил}-*N',N'*-диметилмочевины, более известной под названием Карипразин, можно осуществить, исходя из *цис/транс*-диастереомерной смеси сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib) в резервуарном реакторе периодического действия ступенчатым способом, в котором:

- a. смесь *транс/цис*-диастереомерной смеси сложных этиловых эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула (Ib) + формула (IIb)) загружают в реактор, работающий в периодическом режиме, в соотношении от примерно 2:98 до примерно 99:1,
- b. трансаминазу, имеющую более чем 40%-ную идентичность последовательности белка последовательности мутантной (W60C) трансаминазы из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1/ или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA: SEQ ID NO: 2/ в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме добавляют в реактор в массовом отношении белок:[субстрат (формула (Ib) + формула (IIb))] в диапазоне от 1:10000 до 1:1,
- c. раствор подходящего кетона, используемого в качестве соединения, являющегося акцептором аминогруппы, добавляют к смеси в субэквимольном количестве,

d. осуществляют стадию очистки посредством кислотной экстракции для удаления образующегося кетонного побочного продукта (формула (IIIb)),

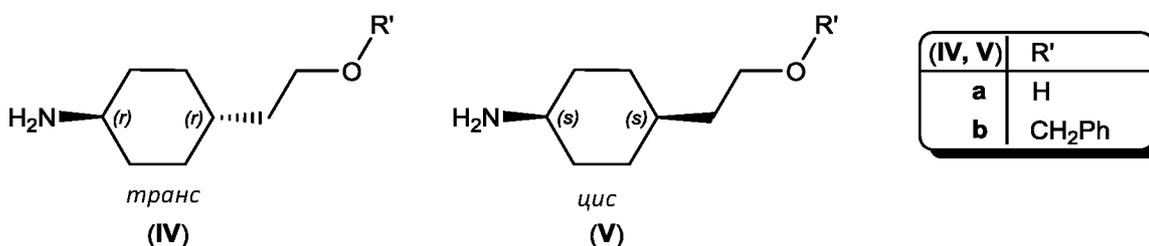
e. желаемый сложный этиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты экстрагируют/отделяют/выделяют в форме свободного амина (формула (Ib)) или его соли (формула (Ib-HA)) с выходом, превышающим

5

долю *транс*-изомера (формула (Ib)) в исходной смеси.

Что касается второго аспекта настоящего изобретения, то настоящее изобретение относится к способу, в котором исходная диастереомерная смесь состоит из производных 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола формулы (IV) и формулы

10



где R' представляет собой атом водорода, или подходящую защитную группу для гидроксила, предпочтительно – бензильную группу, в форме свободного основания или в форме соли.

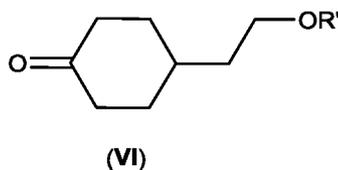
15

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют пируват натрия в субэквимольных количествах.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют

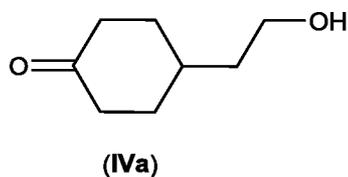
20

4-замещенный циклогексанон формулы (VI)



где R' представляет собой атом водорода или такую же подходящую защитную группу для гидроксила, предпочтительно – бензильную группу, как определено для формул (IV) и (V).

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения 2-(4-оксоциклогексил)этан-1-ол формулы (VIa)



используют в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы,.

- 5 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве трансаминазы в периодическом режиме используют мутантный (W60C) фермент из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 1/.

10 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 1/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

15 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве трансаминазы в периодическом режиме используют фермент из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 2/.

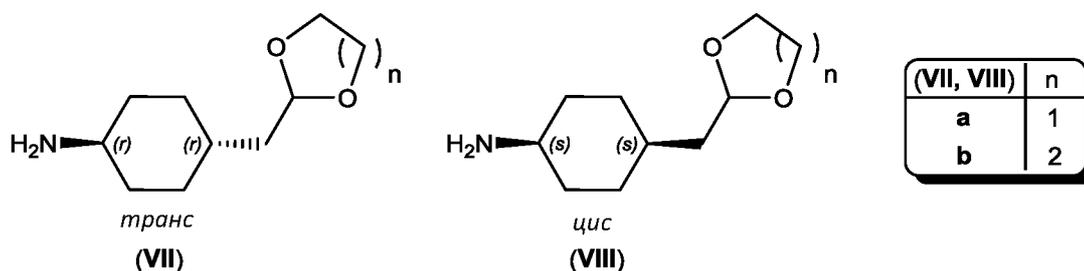
20 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения трансаминазу из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 2/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

25 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ используют в режиме непрерывного потока.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения используют *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ с ковалентной иммобилизацией на пористой полимерной основе.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, исходя из диастереомерной смеси гидрохлоридной соли 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола (формула IVa·HCl + формула Va·HCl), получают чистый 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)этан-1-ол (формула IVa).

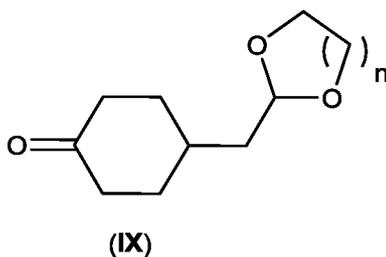
- 5 Что касается третьего аспекта настоящего изобретения, то настоящее изобретение относится к способу, в котором исходная диастереомерная смесь состоит из производных 2-(4-аминоциклогексил)ацетальдегида формулы (VII) и формулы (VIII)



- 10 где *n* является целым числом от 1 до 2.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют пируват натрия в субэквимольных количествах.

- 15 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют 4-замещенный циклогексанон формулы (IX)



где *n* представляет собой такое же целое число, как определено в формулах (VII) и (VIII).

- 20 Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве трансаминазы в периодическом режиме используют мутантный (W60C) фермент из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 1/.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 1/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения в качестве трансаминазы в периодическом режиме используют фермент из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 2/.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения трансаминазу из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 2/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ используют в режиме непрерывного потока.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения используют *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ с ковалентной иммобилизацией на пористой полимерной основе.

Согласно этому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, исходя из диастереомерной смеси 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминов (формула VIIa + формула VIIIa), получают чистый *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин (формула VIIa).

Изобретение иллюстрируется следующими не ограничивающими его примерами.

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Материалы

Если не указано иное, все растворители и химикаты были закуплены у следующих коммерческих поставщиков: Sigma Aldrich (Сент-Луис, Мичиган, США),

Alfa Aesar Europe (Карлсруэ, Германия), Merck (Дармштадт, Германия), Fluka (Милуоки, Висконсин, США) и использовались без дополнительной очистки. MAT540 (MATSPHERE™ SERIES 540 – протравленные полые силикагелевые микросферы с аминоалкильными и винильными функциональными группами и средним диаметром частиц, равным 10 мкм) были получены из компании Materium Innovations (Гранби, Квебек, Канада). Этиленамин-функционализированные метакриловые полимерные смолы (ReliZyme™ EA403/S; полиметилметакрилатные основы, размеры частиц 150-300 мкм, размер пор 400-600 Å) и эпоксид-функционализированные метакриловые полимерные смолы ReliZyme™ EP403/S; полиметилметакрилатные основы, размер частиц 150-300 мкм, размер пор 400-600 Å) были закуплены в компании Resindion S.r.l. (Бинаско, Италия).

Образцы 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорида в форме *цис/транс*-диастереомерной смеси [Г·HCl + С·HCl (G= COOH)] и *цис*-диастереомер сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорида (IIb·HCl с *de* приблизительно 90,2%) были получены из производственного процесса промышленного масштаба согласно WO2010/070368. *Трет*-бутил-*N*-[4-(2-гидроксиэтил)циклогексил]карбамат можно получить так, как раскрыто Wu Y.-J., et al. (WO2018081384 A1 (2018)).

Аналитические методы

Тонкослойная хроматография

Тонкослойную хроматографию (TLC; от англ.: thin layer chromatography) выполняли использованием пластин из кизельгеля Kieselgel 60 F254 (производства компании Merck). Пятна визуализировали под УФ-излучением (Vilber Lourmat VL-6.LC, 254 нм) или после обработки 5% раствором фосфомолибденовой кислоты в этаноле или 3% раствором нингидрина в изопропанолe и нагревания до получения сухих пластин.

Инфракрасная спектроскопия

Инфракрасные спектры были зарегистрированы на ИК-спектрометре Bruker ALPHA FT-IR с Фурье-преобразованием, и волновые числа полос указаны в см⁻¹.

Газовая хроматография

Были проанализированы реакционные смеси ТА-катализируемого восстановительного аминирования кетонов (общие формулы K, III, VI и IX) или

динамической изомеризации 4-замещенных циклогексан-1-аминов (общие формулы C+T, I+II, IV+V и VII+VIII) – после модификации аминов в соответствующие ацетамиды посредством обработки избытком уксусного ангидрида в этилацетатном растворе – на газовом хроматографе Agilent 5890 GC (Санта-Клара, США),
 5 оборудованном пламенно-ионизационным детектором (FID; от англ.: flame ionization detector), с использованием неполярной HP-5 колонки [Agilent J&W; 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм толщины пленки 5%-ного фенилметилполисилоксана] или на газовом хроматографе Agilent 4890 GC, оборудованном колонкой для хирального анализа Hydrodex β-6 TBDM (Macherey-Nagel; 25 м × 0,25 мм × 0,25 мкм толщины пленки
 10 гептакис-(2,3-ди-О-метил-6-О-трет-бутил-диметилсилил)-β-циклодекстрина) с использованием H₂ в качестве газа-носителя (инжектор: 250°C, детектор: 250°C, давление на входе в колонку: 12 фунтов/кв. дюйм, деление потока: 50:1).
Температурные программы: TP1: 180-210°C при 5°C/мин, 210°C в течение 4 минут; TP2: 110-130°C при 1°C/мин, 180°C в течение 3 минут.

15 Времена удерживания:

1,45 мин (соединение IIIa), 2,91 мин (ацетамид соединения IIa), 3,11 мин (ацетамид соединения Ia) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов Ia+IIa / IIIa) = 1,06];

20 1,95 мин (соединение IIIb), 3,93 мин (ацетамид соединения IIb), 4,11 мин (ацетамид соединения Ib) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов Ib+IIb / IIIb) = 1,03];

1,58 мин (соединение IIId), 4,20 мин (ацетамид соединения IIд), 4,40 мин (ацетамид соединения Id) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов Id+IIд / IIIд) = 0,96];

25 1,69 мин (соединение VIa), 3,82 мин (ацетамид соединения IVa), 3,96 мин (ацетамид соединения Va) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов IVa+Va / VIa) = 1,05];

30 1,71 мин [соединение VI (R=Ac)], 3,81 мин [ацетамид соединения IV (R=Ac)], 3,94 мин [ацетамид соединения V (R=Ac)] [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов IV+V (R=Ac) / VI (R=Ac) = 1,03];

1,91 мин (соединение IXa), 4,45 мин (ацетамид соединения VIIa), 4,60 мин (ацетамид соединения VIIIa) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов VIIa+VIIIa / IXa) = 1,05];

2,28 мин [соединение IX (n=2)], 5,49 мин [ацетамид соединения VII (n=2)], 5,65 мин [ацетамид соединения VIII (n=2)] [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов VII+VIII (n=2) / IX (n=2) = 1,03];

3,45 мин (соединение K (G=H)), 19,72 мин (ацетамид соединения T (G=H)), 20,29 мин (ацетамид соединения C (G=H)) [на колонке Hydrodex с TP2, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов (C+T (G=H)) / K (G=H)) = 1,90];

5,99 мин (соединение K (G=Me)), 22,64 мин (ацетамид соединения C (G=Me)), 22,85 мин (ацетамид соединения T (G=Me)) [на колонке Hydrodex с TP2, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов (C+T (G=Me)) / K (G=Me)) = 1,16];

2,32 мин (соединение K (G=Ph)), 5,17 мин (ацетамид соединения C (G=Ph)), 5,51 мин (ацетамид соединения T (G=Ph)) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов (C+T (G=Ph)) / K (G=Ph)) = 1,06];

2,74 мин (соединение K (G=CH₂Ph)), 6,24 мин (ацетамид соединения C (G=CH₂Ph)), 6,56 мин (ацетамид соединения T (G=CH₂Ph)) [на колонке HP-5 с TP1, молярный коэффициент отклика (сигналы от ацетамидов (C+T (G=CH₂Ph)) / K (G=CH₂Ph)) = 0,89].

20 *Масс-спектроскопия*

Анализы посредством масс-спектрометрии высокого разрешения (русскоязычное сокращение – МСВР; сокращение в латинице – HRMS, от англ. high resolution mass spectrometry) и тандемной масс-спектрометрии (русскоязычное обозначение – МС-МС; обозначение в латинице – MS-MS) были выполнены с использованием системы Thermo Velos Pro Orbitrap Elite (производства компании Thermo Fisher Scientific). Способом ионизации была электрораспылительная ионизация (русскоязычное сокращение – ЭПИ; обозначение в латинице – ESI, от англ. electrospray ionization). Пики протонированных молекулярных ионов фрагментировали посредством диссоциации, индуцированной столкновением (CID, от англ. collision-induced dissociation), при нормализованной энергии столкновения, равной 35%. В CID эксперименте в качестве газа для соударений был выбран гелий.

Образцы растворяли в метаноле. Получение и анализ данных были выполнены с использованием программы Xcalibur, версия 2,0 (компания Thermo Fisher Scientific).

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Все образцы для ЯМР растворяли в растворителе - дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО- d_6) и спектры получали в стандартных 5-миллиметровых трубках при 25°C с использованием любого из следующих Avance III HDX спектрометров производства компании Bruker BioSpin GmbH, Рейнштеттен, Германия (приведены частоты для протонов): 400 МГц (с криодатчиком 1H-19F/15N-31P Prodigy CryoProbe и устройством для замены проб Sample Case), 500 МГц (с криодатчиком с расширенным диапазоном температур 500 S2 1H/13C/15N TCI Extended Temperature CryoProbe) или 800 МГц (с криодатчиком 800 SA 1H&19F/13C/15N TCI CryoProbe).

Общая процедура синтеза (4-алкоксикарбонилметил)циклогексанона (III)

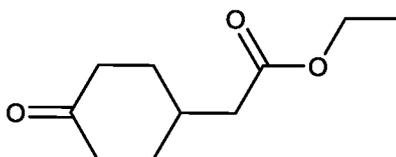
Раствор предварительно промытого гексаном гидрида натрия (1,7 экв.) в сухом тетрагидрофуране (50 мл) охладили до (-5)-0°C. Поддерживая температуру в диапазоне от 0°C до -5°C, добавили раствор соответствующего фосфоната (1,2 экв. этил-2-(диэтоксифосфорил)ацетата или изопропил-2-(диизопропоксифосфорил)ацетата) в сухом тетрагидрофуране (50 мл) и полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 0,5 ч и при комнатной температуре в течение 1 ч. После повторного охлаждения до (-5)-0°C по каплям добавили раствор 1,4-циклогександион моноэтиленкетала (1 экв.: приблизительно 80 ммоль) в сухом тетрагидрофуране (ТГФ) (50 мл) и полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем при комнатной температуре в течение ночи. ТГФ испарили из реакционной смеси и остаток разбавили рассолом (60 мл), а водную фазу экстрагировали этилацетатом (3x80 мл). Объединенные органические фазы промыли насыщенным рассолом (80 мл) и высушили над Na_2SO_4 , затем сконцентрировали в вакууме с получением неочищенного алкил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-илиден)ацетата.

Без дальнейшей очистки ненасыщенный сырой алкил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-илиден)ацетат гидрогенизировали. После растворения в соответствующем спирте (50-200 мл) раствор обработали 10% Pd/C (10 масс. %) и водородом при давлении 1 бар до завершения гидрогенизации (с последующей TLC, элюент: гексан:EtOAc=2:1). После завершения реакции смесь профильтровали через Celite® и удалили растворитель посредством ротационного вакуумного

испарения с получением насыщенного алкил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-ил)ацетата.

Для удаления защитной группы для кетона алкил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-ил)ацетат (1 экв.) растворили в соответствующем спирте (100-150 мл) и охладили до 0°C. По каплям добавили 1N раствор HCl (3 экв.) и перемешивали при 0°C в течение 1 ч, затем при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции смесь охладили до 0°C и довели pH до pH 7 1N раствором NaOH. Смесь экстрагировали этилацетатом (3x80 мл) и объединенные органические фазы экстрагировали насыщенным рассолом (80 мл), высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очистили посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: гексан-EtOAc=4:1) получением (4-алкоксикарбонилметил)циклогексанона (характеризующегося формулой III).

Этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат (IIIb)



(IIIb)

Согласно общему описанию, реакция раствора этил-2-(диэтоксифосфорил)ацетата (18,3 мл, 20,7 г, 92,2 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) и промытого гексаном NaN (3,69 г, 154 ммоль) в сухом ТГФ (40 мл) с 1,4-циклогександион моноэтиленкеталем (12,0 г, 76,8 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) дала этил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-илиден)ацетат (16,8 г, выход неочищенного продукта 97%) в форме бесцветной жидкости.

Реакция этил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-илиден)ацетата (16,7 г, 71,0 ммоль) и 10% Pd/C (1,67 г) в этаноле (70 мл) в атмосфере водорода при нормальном давлении дала этил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-ил)ацетат (16,5 г, выход неочищенного продукта 98%) в форме бесцветного масла.

Реакция этил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-ил)ацетата (15,0 г, 65,7 ммоль) в этаноле (150 мл) с 1N HCl (150 мл) дала этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат (формула IIIb, 5,32 г, выход неочищенного продукта 42%) в форме бесцветного масла.

^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ_{H} : 4,07 (2H, q, $J=7,1$ Гц, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 2,39 (2H, td, $J=13,7$ Гц, $J=5,9$ Гц, $2\times\text{CH}_{\text{ax}}$), 2,31 (2H, d, $J=7,1$ Гц, $\text{CH}_2\text{-COOEt}$), 2,21-2,15 (2H+1H, m, $2\times\text{CH}_{\text{eq}}+\text{CH}_{\text{ax}}\text{-CH}_2\text{COOEt}$), 1,98-1,92 (2H, m, $2\times\text{CH}_{\text{eq}}$), 1,40 (2H, qd, $J=12,1$ Гц, $J=4,3$ Гц, $2\times\text{CH}_{\text{ax}}$), 1,19 (3H, t, $J=7,1$ Гц, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$);

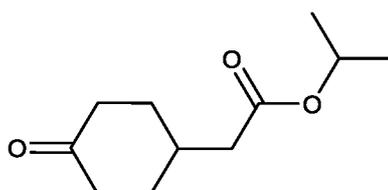
5 ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ_{C} : 210,4 (CO), 171,9 ($\text{CH}_2\text{-COOEt}$), 59,7 ($\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 39,8 (CH_2), 39,3 (CH_2), 32,3 ($\text{CH-CH}_2\text{COOEt}$), 31,5 (CH_2), 14,0 (CH_3);

ЭРИ-МСВР: $M+N=185,11727$ (дельта=0,3 млн $^{-1}$; $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_3$). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 167(60) и 139(100).

ИК (чист.) ν_{max} : 2933, 1710, 1449, 1368, 1345, 1278, 1201, 1150, 1094, 1029, 968, 754,
10 503 cm^{-1} .

ГХ (колонка НР 5): $t_{\text{R}}= 1,95$ мин.

Изопропил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат (IIIId)



(IIIId)

Согласно общему описанию, реакция изопропил-2-
15 (диизопропоксифосфорил)ацетата (25,00 г, 93,3 ммоль) с промытым гексаном NaH (3,75 г, 156,4 ммоль) в сухом ТГФ (100 мл) с 1,4-циклогександионмоноэтиленкеталем (12,2 г, 78,2 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) дала изопропил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-илиден)ацетат (17,1 г, выход неочищенного продукта 91%) в форме бесцветной жидкости.

20 Реакция изопропил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-илиден)ацетата (15,00 г, 62,46 ммоль) и 10% Pd/C (1,5 г) в изопропанол (220 мл) в атмосфере водорода при нормальном давлении дала изопропил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-ил)ацетат (14,6 г, выход неочищенного продукта 97%) в форме бесцветного масла.

25 Реакция изопропил-2-(1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-ил)ацетата (14,00 г, 57,85 ммоль) в изопропанол (170 мл) и 1N HCl (170 мл) дала этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат (формула IIIId, 8,47 г, выход очищенного продукта 74%) в форме бесцветного масла.

^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ_{H} : 4,91 (1H, quint, $J=6,3$ Гц, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 2,39 (2H, td, $J=13,8$ Гц, $J=6,0$ Гц, $2\times\text{CH}_{\text{ax}}$), 2,28-2,27 (2H, m, CH_2), 2,19-2,14 (1H+2H, m, $\text{CH}_{\text{ax}}-\text{CH}_2\text{COO}^i\text{Pr}$, $2\times\text{CH}_{\text{eq}}$), 1,96-1,92 (2H, m, $2\times\text{CH}_{\text{eq}}$), 1,40 (2H, qd, $J=13,0$ Гц, $J=4,1$ Гц, $2\times\text{CH}_{\text{ax}}$), 1,19 (6H, d, $J=6,3$ Гц, $2\times\text{CH}_3$);

5 ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ_{C} : 210,4 (CO), 171,4 (COO^iPr), 66,9 ($\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 39,6 ($\text{CH}_2-\text{COO}^i\text{Pr}$), 32,3 ($\text{CH}-\text{CH}_2\text{COO}^i\text{Pr}$)+ CH_2), 31,4 (CH_2), 21,5 (CH_3);

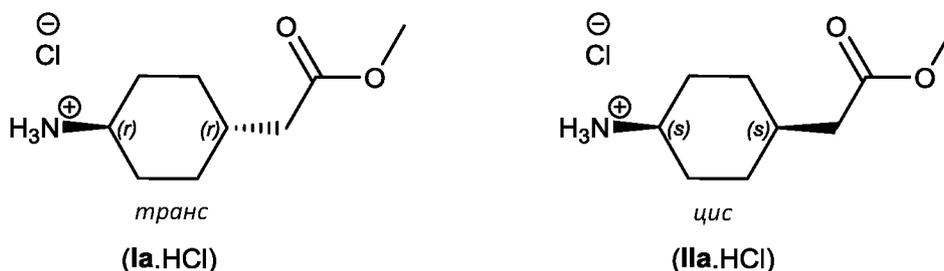
МСВР: $\text{M}+\text{H}=199,13276$ (дельта= $-0,6$ млн $^{-1}$; $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_3$). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 181(5); 171(11); 167(100); 157(62); 153(91) и 139(64);

ИК (чист.) ν_{max} : 2979, 1711, 1449, 1374, 1278, 1203, 1161, 1107, 967 cm^{-1} .

10 ГХ (колонка НР): $t_{\text{R}}=1,58$ мин.

Цис/транс-диастереомерные смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминия хлоридов (соединения I·HCl + II·HCl или соединения C·HCl + T·HCl)

4-(2-метокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (соединения Ia·HCl + IIa·HCl)



15

К раствору 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты [цис/транс-диастереомерная смесь, T·HCl + C·HCl ($\text{G}=\text{COOH}$)] (1 г, 6,37 ммоль) в метаноле (60 мл) добавили 5М раствор соляной кислоты (9,56 ммоль, 1,911 мл, 1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут (за это время первоначально опалесцирующий раствор стал прозрачным), и ТСХ-анализ (элюент: н-бутанол:уксусная кислота:вода=3:1:1; визуализация 3% нингидрином в изопропанол; $\text{Rf}_{\text{acid}}=0,62$, $\text{Rf}_{\text{Me ester}}=0,68$) выявил полную конверсию. Затем растворитель удалили с использованием ротационного вакуумного испарителя и остаток высушили в вакуумной сушильной камере с получением диастереомерной смеси желаемой гидрохлоридной соли сложного метилового эфира (соединения Ia·HCl + IIa·HCl, 1,28 г, выход 97%) в форме белого твердого вещества.

20

25

ИК (НПВО – спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения) ν_{\max} : 2934, 2895, 2863, 1732, 1610, 1507, 1458, 1437, 1365, 1295, 1226, 1168, 1132, 1018 cm^{-1} .

(1*s*,4*s*)-4-(2-метокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (цис-соединение IIa·HCl)

5 ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ_{H} : 8,12 (3H, br, NH_3^+), 3,58 (3H, s, OCH_3), 3,29 (1H, m, $\text{CH}_{\text{екв}}\text{-NH}_3^+$), 2,33 (2H, d, $J=7,5$ Гц, CH_2COOMe), 1,95 (1H, m, $\text{CH}_{\text{eq}}\text{-CH}_2\text{COOMe}$), 1,81-1,74 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 1,70-1,58 (4H, m, $4\times\text{CH}$), 1,46-1,35 (2H, m, $2\times\text{CH}$).

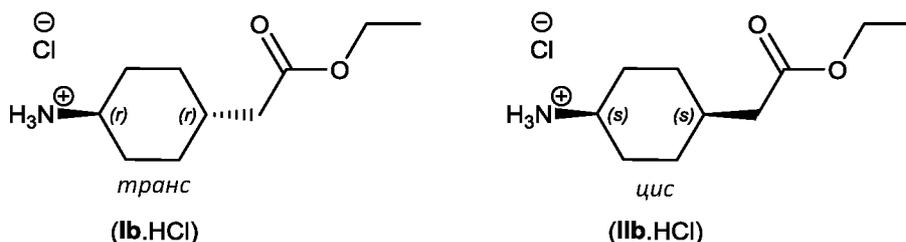
^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ_{C} : 176,39 (COO), 52,14 (OCH_3), 48,53 (NCH), 38,15 (CH_2), 30,65 (CH), 26,23 ($2\times\text{CH}_2$), 26,06 ($2\times\text{CH}_2$).

10 (1*r*,4*r*)-4-(2-метокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (транс-соединение Ia·HCl)

^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ_{H} : 8,12 (3H, br, NH_3^+), 3,59 (3H, s, OCH_3), 3,04 (1H, m, $\text{CH}_{\text{ax}}\text{-NH}_3^+$), 2,21 (2H, d, $J=7,6$ Гц, CH_2COOMe), 1,98-1,86 (2H, m, $2\times\text{CH}_{\text{eq}}$), 1,75 (1H, m, $\text{CH}_{\text{ax}}\text{-CH}_2\text{COOMe}$), 1,72 (2H, br d, $J=14,0$ Гц, $\text{CH}_{\text{eq}}\text{CHNH}_3^+$), 1,46-1,35 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 1,02 (2H, qd, $J=12$ Гц, $J=4$ Гц, $2\times\text{CH}_{\text{ax}}$).

^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ_{C} : 176,43 (COO), 52,09 (OCH_3), 48,87 (NCH), 40,48 (CH_2), 33,01 (CH), 29,89 ($2\times\text{CH}_2$), 29,85 ($2\times\text{CH}_2$).

4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (соединения Ib·HCl + IIb·HCl)



Реакция этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетата (IIIb, 1,50 г, 8,14 ммоль) и 10% Pd/C (0,15 г) с формиатом аммония (3,08 г, 48,8 ммоль) в этаноле (40 мл) дала диастереомерную смесь 4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-амина (соединения Ib + IIb, выход 83%, цис/транс = 2,30:1,00 (^1H ЯМР)) в форме бесцветного масла. В заключение, после подачи газообразного HCl образовался 4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (соединения Ib·HCl + IIb·HCl, 1,30 г, выход 72%) в форме белого твердого вещества.

25

(1*s*,4*s*)-4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (цис-соединение IIb·HCl)

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,14 (3H, br, NH₃⁺), 4,09-4,02 (2H, m, OCH₂), 3,18-3,09 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,27 (2H, d, J=7,5 Гц, CH₂COOEt), 1,98-1,86 (1H, m, CH_{eq}-CH₂COOEt), 1,69-1,62 (4H, m, 4×CH), 1,53-1,43 (4H, m, 4×CH), 1,18 (3H, t, J=7,2 Гц, CH₃),

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 171,96 (CO), 59,62 (OCH₂), 47,2 (CH-NH₃⁺), 37,92 (CH₂COOEt), 30,58 (CH_{ax}-CH₂COOEt), 25,96 (CH₂), 25,89 (CH₂), 14,04 (CH₃).

(1*r*,4*r*)-4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (транс-соединение IIb·HCl)

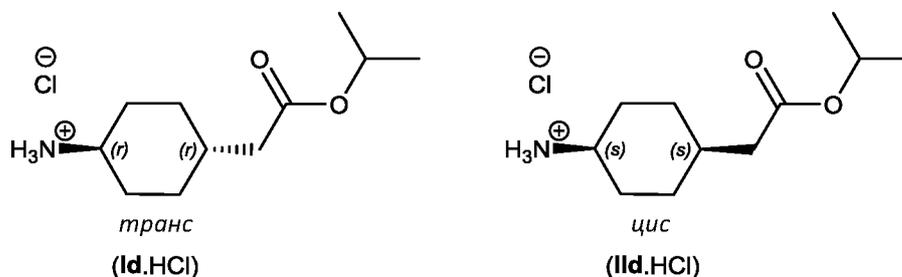
¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,14 (3H, br, NH₃⁺), 4,09-4,02 (2H, m, OCH₂), 2,94-2,82 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,18 (2H, d, J=7,6 Гц, CH₂COOEt), 1,98-1,86 (2×H, m, 2×CH_{eq}), 1,72 (2H, br d, J=14,0 Гц, CH_{eq}CHNH₃⁺), 1,64-1,55 (1H, m, CH_{ax}-CH₂COOEt), 1,34 (2H, qd, J=12,4 Гц, J=3,1 Гц, 2×CH_{ax}), 1,18 (3H, t, J=7,2 Гц, CH₃), 1,03 (2H, qd, J=12,7 Гц, J=3,5 Гц, 2×CH_{ax}).

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 171,8 (CO), 59,6 (OCH₂), 48,9 (CH-NH₃⁺), 40,3 (CH₂COOEt), 33,1 (CH_{ax}-CH₂COOEt), 29,8 (CH₂), 29,75 (CH₂), 14,0 (CH₃);

МСВР: М+Н=186,14853 (дельта=-1.8 млн⁻¹; C₁₀H₂₀O₂N). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн.инт. %): 169(100); 141(2); 140(2); 123(9); 95(15) и 81(6);

ИК (чист.) ν_{max}: 2933, 2552, 2037, 1731, 1604, 1509, 1451, 1370, 1291, 1177, 1033 см⁻¹.

4-(2-изопропокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (соединения Id·HCl + IId·HCl)



Реакция изопропил-2-(4-оксоциклогексил)ацетата (IIIId, 2,00 г, 10,1 ммоль) и 10% Pd/C (0,20 г) с аммония формиатом (3,82 г, 60,5 ммоль) в изопропанол (40 мл) дала диастереомерную смесь 4-(2-изопропокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-амина

(соединения Id + IId, 1,71 г, выход 85%, *цис/транс*= 1,07:1,00 (^1H -ЯМР)) в форме бесцветного масла. В заключение, после подачи газообразного HCl образовался 4-(2-изопропокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (соединения Id·HCl + IId·HCl, 1,75 г, выход 73%) в форме белого твердого вещества.

5 (1*s*,4*s*)-4-(2-изопропокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (*цис*-соединение Id·HCl)

^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ_{H} : 8,10 (3H, br, NH_3^+), 4,89 (1H, quint, $J=6,25$ Гц, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 3,13 (1H, quint, $J=5,6$ Гц, $\text{CH}_{\text{eq}}-\text{NH}_3^+$), 2,21 (2H, d, $J=7,55$ Гц, $\text{CH}_2-\text{COO}^i\text{Pr}$), 1,95-1,89 (1H, m, $\text{CH}_{\text{ax}}-\text{CH}_2\text{COO}^i\text{Pr}$), 1,67-1,64 (4H, m, $4\times\text{CH}$), 1,53-1,43 (4H, m, $4\times\text{CH}$), 1,18 (6H, d, $J=1,71$ Гц, $2\times\text{CH}_3$),

^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ_{C} : 171,5 (CO); 66,9 ($\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$); 47,3 ($\text{CH}-\text{NH}_3^+$), 38,2 ($\text{CH}_2-\text{COO}^i\text{Pr}$), 30,6 ($\text{CH}-\text{CH}_2\text{COO}^i\text{Pr}$), 26,0 (CH_2), 25,9 (CH_2), 21,5 (CH_3).

(1*r*,4*r*)-4-(2-изопропокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (*транс*-соединение Id·HCl)

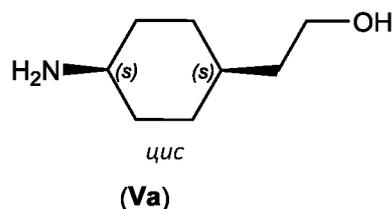
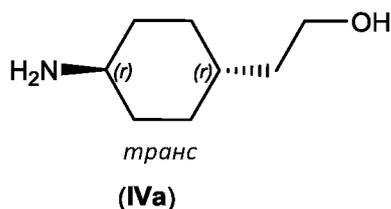
15 ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ_{H} : 8,10 (3H, br, NH_3^+), 4,88 (1H, quint, $J=6,25$ Гц, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 2,88 (1H, tt, $J=11,8$ Гц, $J=3,9$ Гц, $\text{CH}_{\text{ax}}-\text{NH}_3^+$), 2,14 (2H, d, $J=6,96$ Гц, $\text{CH}_2-\text{COO}^i\text{Pr}$), 1,95-1,89 (2H, m, $2\times\text{CH}_{\text{eq}}$), 1,73-1,70 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 1,62-1,55 (1H, $\text{CH}_{\text{ax}}-\text{CH}_2\text{COO}^i\text{Pr}$), 1,33 (2H, qd, $J=12,7$ Гц, $J=3,2$ Гц, $2\times\text{CH}_{\text{ax}}$), 1,17 (6H, d, $J=1,75$ Гц, $2\times\text{CH}_3$), 1,02 (2H, qd, $J=12,8$ Гц, $J=3,2$ Гц, $2\times\text{CH}$);

20 ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ_{C} : 171,3 (CO); 66,9 ($\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$); 48,9 ($\text{CH}-\text{NH}_3^+$), 40,6 ($\text{CH}_2-\text{COO}^i\text{Pr}$), 33,2 ($\text{CH}-\text{CH}_2\text{COO}^i\text{Pr}$), 29,8 (CH_2), 29,7 (CH_2), 21,5 (CH_3);

МСВР: $M+N=200,16423$ ($\delta_{\text{C}}=-1.4$ млн $^{-1}$; $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}$). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 183(5); 158(5); 141(100); 140(4); 123(6) и 81(8).

ИК (чист.) ν_{max} : 2944, 2627, 2553, 2056, 1729, 1607, 1510, 1458, 1391, 1297, 1182, 1107 cm^{-1} .

2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ол (соединения IVa + Va)



В круглодонную колбу добавили NaBH_4 (173 мг, 4,5 ммоль), тетрагидрофуран (ТГФ, 15 мл) и *цис/транс*-2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорид [$\text{T}\cdot\text{HCl} + \text{C}\cdot\text{HCl}$ ($\text{G} = \text{COOH}$)] (300 мг, 1,91 ммоль). К этой смеси по каплям добавили раствор, приготовленный из йода (483 мг, 1,91 ммоль) и ТГФ (4,5 мл), при 0°C (что привело к экзотермической реакции с выделением газа) и образующую смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 24 ч. После охлаждения до 0°C по каплям добавили метанол (8 мл) (что привело к нагреванию и выделению газа и к растворению образовавшейся белой суспензии). После испарения растворителя под вакуумом оставшийся неочищенный продукт очистили посредством препаративной тонкослойной хроматографии (силикагель, дихлорметан:метанол=20:1 в качестве элюента) с получением диастереомерной смеси спиртов IVa + Va (173,2 мг, выход 63,6%, *цис/транс* приблизительно 46:54) в форме белого порошкообразного твердого вещества.

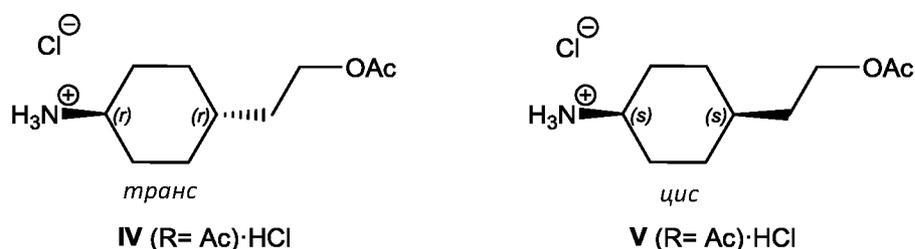
Температура плавления: 92°C .

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{DMCO-}d_6$) δ_{H} : 3,54 (2H, t, $J = 5,4$ Гц, OCH_2), 2,67 и 2,41 (1H, m, CH-N), 2,00 (1H, m); 1,71 (1H, m); 1,60-1,25 (6H, m); 1,25-1,15 (1H, m); 1,08 (1H, q); 0,89 (1H, q).

^{13}C ЯМР (125 МГц, $\text{DMCO-}d_6$) δ_{C} : 62,31 и 62,19 (OCH_2), 58,67 и 56,46 (CHN), 40,69 (CHCH_2), 35,37 (CH), 33,55 и 33,40 ($2\times\text{CH}_2$), 29,49 и 29,10 ($2\times\text{CH}_2$).

ИК (НПВО) ν_{max} : 3483, 3455, 3259, 3227, 3141, 2925, 2888, 2877, 2856, 1598, 1454, 1445, 1356, 1327, 1164, 1050, 874 cm^{-1} .

4-(2-ацетоксиэтил)циклогексан-1-аминия хлорид [соединения IV ($\text{R} = \text{Ac}$) + V ($\text{R} = \text{Ac}$)]



25 *Трет*-бутил-*N*-[4-(2-ацетоксиэтил)циклогексил]карбамат

К раствору *трет*-бутил-*N*-[4-(2-гидроксиэтил)циклогексил]карбамата [Wu Y.-J., et al (WO2018081384 A1 (2018))] (0,4 г, 1,64 ммоль), триэтиламина (0,4 мл) и 4-

диметиламинопиридина (24 мг) в дихлорметане (15 мл) по каплям при 0°C добавили ацетилхлорид (0,175 мл, 2,46 ммоль), затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. После испарения летучих веществ в вакууме остаток очистили на колонке с силикагелем с использованием смеси дихлорметана:метанола в соотношении 20:1 в качестве элюента с получением титульного продукта [соединения IV (R= Ac) + V (R= Ac)] (0,39 г, 83%) в форме вещества, которое кристаллизовалось в холодильнике.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ_H: 4,57 и 4,3 (1H, br, NH), 4,0 (2H, q, J= 6,5 Гц, OCH₂), 3,64 и 3,28 (1H, br, CHN), 1,97 (3H, s, COCH₃), 1,9 (1H, d, J= 10 Гц), 1,7 (1H, d, J= 11 Гц), 1,6-1,4 (5H, m), 1,38 (9H, s, 3×CH₃), 1,3-1,1 (2H, m), 1,05-0,9 (2H, m).

¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ_C: 171,25 (COCH₃), 155,27 (CONH), 79,12 (C), 62,66 (OCH₂), 49,87 и 46,52 (CHNH), 35,38 и 33,8 (CH₂), 33,3 (CH₂), 34,09 и 32,57 (CH), 31,69 (CH₂), 29,59 (CH₂), 28,44 (3×CH₃), 27,71 (CH₂), 21,02 (COCH₃).

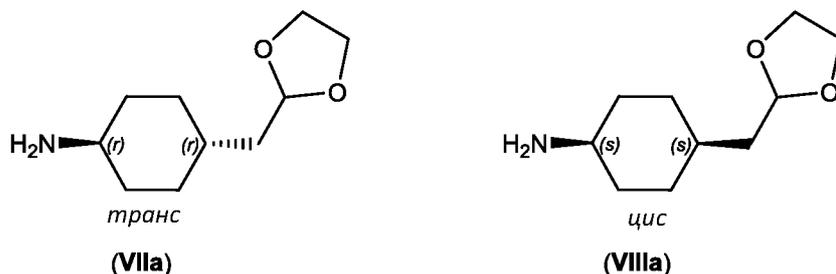
4-(2-ацетоксиэтил)циклогексан-1-аминия хлорид [соединения IV (R= Ac)·HCl + V (R= Ac)·HCl]

К раствору *трет*-бутил-*N*-[4-(2-ацетоксиэтил)циклогексил]карбамата (0,39 г) в этилацетате (3,5 мл) добавили 20%-ный раствор соляной кислоты в этилацетате (2,4 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Испарение растворителя под вакуумом привело к получению титульных соединений (0,30 г, 100%).

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ_H: 8,33 и 4,60-4,10 (3H, br, NH₃⁺), 4,1 (2H, q, J= 6,5 Гц, OCH₂), 3,47 и 3,12 (1H, br, CHN), 2,20 (1H, d, J= 11,5 Гц), 2,06 и 2,05 (3H, s, COCH₃), 2,00-1,93 (1H, m), 1,88 (1H, d, J= 13 Гц), 1,85-1,75 (1H, m), 1,72-1,5 (5H, m), 1,5-1,2 (1H, m), 1,03 (1H, q, J= 13 Гц).

¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ_C: 171,22 (COCH₃), 62,40 и 62,21 (OCH₂), 50,95 и 48,73 (NHN), 35,06 (CH₂), 32,91 (CH₂), 33,26 и 31,50 (CH), 30,71 (CH₂), 30,68 (CH₂), 27,45 (CH₂), 26,42 (CH₂), 21,01 (COCH₃).

4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин (соединения VIIa + VIIIa)

*Трет*-бутил(4-(2-оксоэтил)циклогексил)карбамат

К раствору *трет*-бутил(4-(2-гидроксиэтил)циклогексил)карбамата (0,2 г, 0,823 ммоль) в сухом дихлорметане (7 мл) добавили пиридиния хлорхромат (PCC; от англ.: pyridinium chlorochromate, 1,3 г) порциями и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Растворитель испарили из смеси под вакуумом и остаток очистили посредством хроматографии на колонке с силикагелем с дихлорметаном с получением титульного соединения (1,12 г, 58%) в форме вязкого масла, которое кристаллизовалось в холодильнике.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ_{H} : 9,76 (1H, s, CHO), 4,64 и 4,4 (1H, br, NH), 3,72 и 3,36 (1H, br, CHN), 2,43-2,3 (2H, dd, CH_2), 2,1-1,7 (2H, m), 1,71-1,55 (3H, m); 1,45 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 1,0-1,35 (4H, m).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3) δ_{C} : 202,2 (CHO), 155,4 (CONH), 79,2 (C-O), 50,7 и 49,6 (CHNH), 39,7 и 38,4 (CH_2), 33,2 (CH_2), 31,7 (CH_2), 30,5 (CH), 29,5 (CH_2), 28,45 ($3\times\text{CH}_3$), 27,8 (CH_2).

Трет-бутил(4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексил)карбамат [согласно Bush-Petersen J., et al; WO 2006050292A2 (2006)]

К раствору *трет*-бутил(4-(2-оксоэтил)циклогексил)карбамата (0,61 г, 2,71 ммоль) в ацетонитриле (11,5 мл) добавили щавелевую кислоту·2 H_2O (33 мг), MgSO_4 (0,5 г) и этиленгликоль (0,61 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. После фильтрации реакционной смеси фильтрат разбавили этилацетатом (40 мл) и промыли насыщенным раствором NaHCO_3 (8 мл), водой (8 мл) и рассолом (8 мл). После сушки органической фазы над Na_2SO_4 растворитель испарили под вакуумом с получением титульного соединения (0,59 г, 74%) в форме густого масла, которое кристаллизовалось в холодильнике (образец содержал

приблизительно 10% *трет*-бутил[4-(2-гидроксиэтил)циклогексил]карбамата в качестве примеси).

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ_H: 4,9 (1H, t, O-CH-O), 4,64 и 4,36 (1H, br, NH), 4,0-3,8 (4H, m, 2xCH₂), 3,70 и 3,36 (1H, br, CHN), 2,1-1,8 (2H, m), 1,71-1,5 (5H, m), 1,45 (9H, s, 3xCH₃), 1,35-1,2 (2H, m), 1,0-1,2 (2H, m).

¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ_C: 155,4 (O=CNH), 103,6 и 103,4 (O-CH-O), 79,1 (C-O), 64,8 (2xOCH₂), 49,8 и 46,5 (CHNH), 40,7 и 33,3 (CH₂), 33,4 (CH₂), 32,1 (CH₂), 39,5 и 32,0 (CH), 29,7 (CH₂), 28,46 (3xCH₃), 28,2 (CH₂).

4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин (соединения VIIa + VIIIa)
10 [согласно Bush-Petersen J., et al; WO 2006050292A2 (2006)]

К раствору *трет*-бутил(4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексил)карбамата (0,57 г, 2,14 ммоль) в этилацетате (5 мл) добавили 20%-ный раствор соляной кислоты в этилацетате (3,5 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После испарения растворителя под вакуумом оставшееся твердое вещество высушили в вакуумной камере с получением (0,45 г, 100%) твердого порошка. (Этот образец содержал 28% свободного альдегида.)

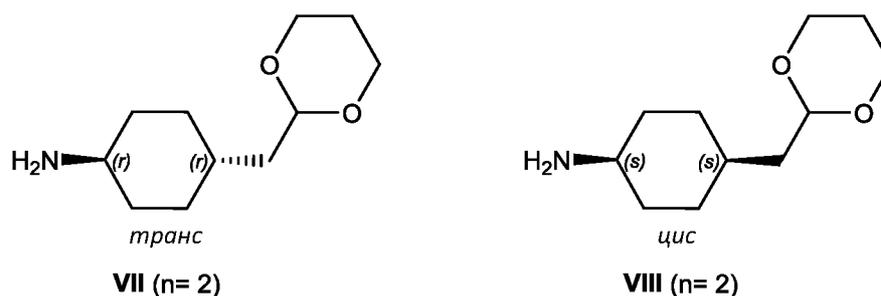
Твердое вещество растворили в этиленгликоле (0,52 мл) и смесь перемешивали при 40°C в течение 8 часов при пониженном давлении (5 мм рт. ст.). После разбавления этилацетатом (40 мл) добавили твердый Na₂CO₃ (0,45 г) и полученную смесь перемешивали в течение нескольких минут. После фильтрации органическую фазу промыли водой (2x10 мл) и рассолом (10 мл). После сушки органической фазы над Na₂SO₄ растворитель испарили в вакууме с получением титульного соединения (0,16 г, 38%) в форме вязкого масла (образец содержал приблизительно 7% 2-(4-аминоциклогексил)этанала и приблизительно 9% 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола в качестве примесей).

Объединенные водные фазы экстрагировали дихлорметаном (3x20 мл) и полученную органическую фазу высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме с получением титульного соединения (23 мг, 6%) в форме вязкого масла (образец содержал приблизительно 1,5% 2-(4-аминоциклогексил)этанала и приблизительно 5,5% 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола в качестве примесей).

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ_{H} : 4,91 (1H, m, OCHO), 3,97 (2H, m, $2\times\text{OCH}$), 3,84 (2H, m, $2\times\text{OCH}$), 2,98 и 2,63 (1H, br, CHN), 2,19 (2H, br, NH_2), 1,91-1,79 (2H, m), 1,72-1,41 (5H, m), 1,35-1,21 (2H, m), 1,01-1,20 (2H, m).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3) δ_{C} : 103,71 и 103,47 (OCHO), 64,69 ($2\times\text{OCH}_2$), 50,56 (CHNH), 40,82 (CH_2), 33,23 ($2\times\text{CH}_2$), 32,2 ($2\times\text{CH}_2$), 31,99 (CH).

4-((1,3-диоксан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин [соединения VII ($n=2$) + VIII ($n=2$)]



Трет-бутил(4-((1,3-диоксан-2-ил)метил)циклогексил)карбамат

10 К раствору *трет*-бутил(4-(2-оксоэтил)циклогексил)карбамата (0,82 г, 3,4 ммоль) в ацетонитриле (15,5 мл) добавили щавелевую кислоту (44,4 мг), MgSO_4 (0,6 г) и пропиленгликоль (1,1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После фильтрации фильтрат разбавили этилацетатом (54 мл) и промыли насыщенным раствором NaHCO_3 (11 мл), водой (11 мл) и рассолом (22

15 мл). После сушки органической фазы над Na_2SO_4 растворитель испарили под вакуумом. Остаток очистили на колонке с силикагелем с использованием смеси дихлорметана:метанола в соотношении 20:1 с получением титульного соединения (0,93 г, 99%) в форме густого масла, которое кристаллизовалось в холодильнике (образец содержал приблизительно 10% *трет*-бутил[4-(2-

20 гидроксипропил)циклогексил]карбамата в качестве примеси).

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ_{H} : 4,64 и 4,37 (1H, br, NH), 4,58 (1H, t, OCHO), 4,21-4,01 (2H, dd, $J=4,5$ Гц и 11,5 Гц, CH_2), 3,76 (2H, t, $J=12,5$ Гц), 3,71 и 3,36 (1H, br, CHN), 2,14-1,90 (2H, m), 1,79 (1H, d, $J=11$ Гц), 1,71-1,51 (5H, m), 1,51-1,46 (1H, m), 1,45 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 1,35 (1H, d, $J=13,5$ Гц), 1,29-1,15 (1H, m), 1,15-1,01 (2H, m).

25 ^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3) δ_{C} : 155,28 (CONH), 101,05 и 100,92 (OCHO), 79,04 (C), 66,92 ($2\times\text{OCH}_2$), 53,42 и 51,43 (CHNH), 42,04 и 32,37 (CH_2), 33,34 (CH_2), 33,13 и 31,60 (CH), 32,00 (CH_2), 29,61 (CH_2), 28,45 ($3\times\text{CH}_3$), 28,13 (CH_2), 25,83 (CH_2).

4-((1,3-диоксан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин (соединения VII+VIII (n= 2))

К раствору *трет*-бутил(4-((1,3-диоксан-2-ил)метил)циклогексил)карбамата (0,65 г, 2,18 ммоль) в этилацетате (5,5 мл) добавили 20%-ный раствор соляной кислоты в этилацетате (4 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После испарения растворителя под вакуумом оставшееся твердое вещество высушили в вакуумной камере с получением (0,53 г, 100%) твердого порошка. (Образец содержал 10% свободного альдегида.)

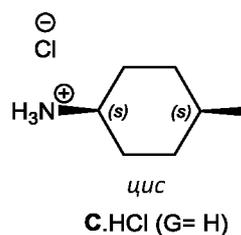
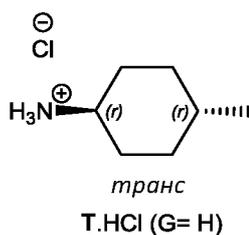
Твердое вещество растворили в пропиленгликоле (0,6 мл) и смесь перемешивали при 40°C в течение 8 часов при пониженном давлении (5 мм рт. ст.). К смеси, разбавленной этилацетатом (40 мл), добавили Na₂CO₃ (0,38 г) и полученную смесь перемешивали в течение нескольких минут. После фильтрации органическую фазу промыли водой (2x10 мл) и рассолом (10 мл). После сушки органической фазы над Na₂SO₄ растворитель испарили в вакууме с получением титального соединения (0,28 г, 60%) в форме вязкого масла (образец содержал приблизительно 12,5% 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола в качестве примеси).

Объединенные водные фазы экстрагировали дихлорметаном (3x20 мл) и полученную органическую фазу высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме с получением титального соединения (0,18 г, 40%) в форме вязкого масла (образец содержал приблизительно 7% 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола в качестве примеси).

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ_H: 4,77 (1H, m, OCHO), 4,10 (2H, m, 2×OCH), 3,82 (2H, m, 2×OCH), 2,98 и 2,63 (1H, br, CHN), 2,42 (2H, br, NH₂), 1,91-1,80 (2H, m), 1,72-1,41 (7H, m), 1,40-1,31 (2H, m), 1,20-1,07 (1H, m), 1,05-0,95 (1H, m).

¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ_C: 101,21 и 101,01 (OCHO), 66,89 (2×OCH₂), 50,61 (CHNH), 42,16 (CH₂), 34,11 (2×CH₂), 32,06 (2×CH₂), 31,71 (CH), 25,82 и 25,68 (OCH₂CH₂CH₂O).

4-метилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения T·HCl + C·HCl (G= H))



Реакция 4-метилциклогексан-1-она (К (G=H)) (5,5 мл, 5,00 г, 44,6 ммоль) и 10% Pd/C (0,50 г) с формиатом аммония (16,86 г, 267,5 ммоль) в метаноле (100 мл) дала 4-метилциклогексан-1-амин (соединения Т + С (G+H)) (3,78 г, выход 75%) в форме бесцветной жидкости. Затем после подачи газообразного HCl образовался 4-метилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= H)) (2,83 г, выход 43%, *цис/транс*=1,00:1,23 (¹H-ЯМР)) в форме белого твердого вещества.

(1*s*,4*s*)-4-метилциклогексан-1-аминия хлорид (*цис*-соединение С·HCl (G= H))

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,12 (3H, br, NH₃⁺), 3,11 (1H, tt, J=6,8 Гц, J=3,9 Гц, CH_{ax}-NH₃⁺), 1,69-1,65 (2H, m, 2×CH), 1,64-1,61 (2H, m, 2×CH), 1,61-1,59 (H, m, CH-CH₃), 1,49-1,44 (2H, m, 2×CH), 1,42-1,35 (2H, m, 2×CH-CH₃), 0,90 (3H, t, J=6,8 Гц, CH₃);

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 47,4 (CH-NH₃⁺), 28,2 (CH-CH₃), 28,1 (CH₂-CHCH₃), 26,1 (CH₂), 19,5 (CH₃);

(1*r*,4*r*)-4-метилциклогексан-1-аминия хлорид (*транс*-соединение Т·HCl (G= H))

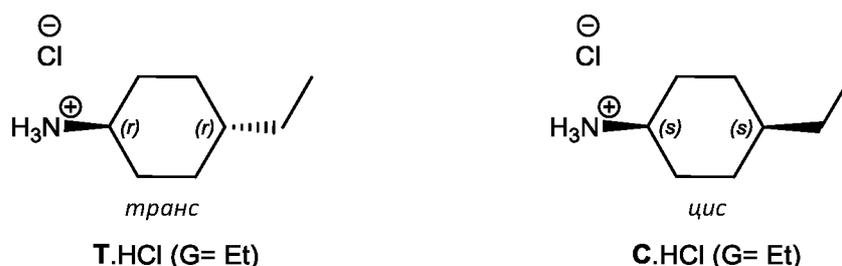
¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,12 (3H, br, NH₃⁺), 2,86 (1H, tt, J=11,8 Гц, J=4,0 Гц, CH_{ax}-NH₃⁺), 1,93-1,91 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,69-1,65 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,32 (2H, qd, J=12,7 Гц, J=3,3 Гц, 2×CH_{ax}), 1,26-1,22 (1H, m, CH_{ax}-CH₃), 0,94 (2H, qd, J=13,1 Гц, J=3,1 Гц, 2×CH_{ax}), 0,85 (3H, t, J=6,5 Гц, CH₃);

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 49,1 (CH-NH₃⁺), 32,3 (CH₂-CHCH₃), 30,9 (CH-CH₃), 30,1 (CH₂), 21,8 (CH₃);

ИК (жидкая пленка) ν_{max}: 2927, 2563, 2049, 161, 1512, 1455, 1392, 1127, 1029 см⁻¹.

МСВР: М+Н=114,12744 (дельта=-2,5 млн⁻¹; C₇H₁₆N). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 97(100).

4-этилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= Me))



Реакция 4-этилциклогексан-1-она (К (G=Me)) (5,6 мл, 5,00 г, 39,6 ммоль) и 10% Pd/C (0,500 г) с формиатом аммония (15,00 г, 237,7 ммоль) в метаноле (100 мл)

дала 4-этилциклогексан-1-амин (соединения Т + С (G=Et)) (4,26 г, выход 85%, *цис:транс*=1,93:1,00) (¹H-ЯМР) в форме бесцветной жидкости. Затем после подачи газообразного HCl образовался 4-этилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= Me)) в форме белого твердого вещества.

5 (1*s*,4*s*)-4-этилциклогексан-1-аминия хлорид (*цис*-соединение С·HCl (G= Me))

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,15 (3H, br, NH₃⁺), 3,12 (1H, br m CH_{eq}-NH₃⁺), 1,68-1,65 (2H, m, 2×CH), 1,64-1,60 (2H, m, 2×CH), 1,49-1,45 (2H, m, 2×CH), 1,44-1,41 (2H, m, 2×CH), 1,29 (1H, m, CH_{ax}-CH₂CH₃), 1,27 (2H, quint, J=7,2 Гц, CH₂CH₃), 0,85 (3H, t, J=7,3 Гц, CH₂CH₃);

10 ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 47,6 (CH-NH₃⁺), 35,3 (CH-CH₂CH₃), 26,2 (CH₂), 25,9 (CH₂), 25,8 (CH₂CH₃), 11,3 (CH₂CH₃).

(1*r*,4*r*)-4-этилциклогексан-1-аминия хлорид (*транс*-соединение Т·HCl (G= Me))

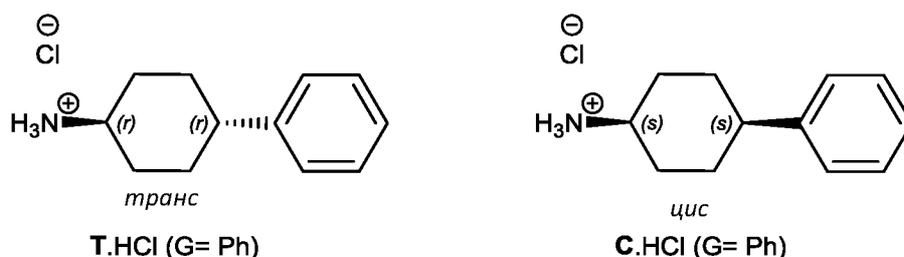
15 ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 7,99 (3H, br, NH₃⁺), 2,87 (1H, br m CH_{ax}-NH₃⁺), 1,96-1,95 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,75-1,74 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,31 (2H, qd, J=12,8 Гц, J=3,4 Гц, 2×CH_{ax}), 1,18 (2H, quint, J=15 Гц, CH₂CH₃), 1,07-1,03 (1H, m, CH_{ax}-CH₂CH₃), 0,91 (2H, qd, J=12,9 Гц, J=3,3 Гц, 2×CH_{ax}), 0,85 (3H, t, J=7,5 Гц, CH₂CH₃);

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 49,4 (CH-NH₃⁺), 37,5 (CH-CH₂CH₃), 30,1 (CH₂), 29,9 (CH₂-CHCH₂CH₃), 28,7 (CH₂CH₃), 11,6 (CH₂CH₃);

20 ИК (жидкая пленка) ν_{max}: 2933, 2575, 2047, 1583, 1505, 1453, 1388, 1236, 1121, 1036 см⁻¹.

МСВР: М+Н=128,14303 (дельта=-2,7 млн⁻¹; C₈H₁₈N). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 111(100) и 69(9).

4-фенилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= Ph))



25 Реакция 4-фенилциклогексан-1-она (К (G=Ph)) (4,00 г, 22,9 ммоль) и 10% Pd/C (0,40 г) с формиатом аммония (8,66 г, 137,4 ммоль) в метаноле (80 мл) дала 4-

фенилциклогексан-1-амин (соединения Т + С (G=Ph)) (2,93 г, выход 73%, *цис/транс*=1,00:3,70) в форме жидкости. Затем после подачи HCl образовался 4-фенилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= Ph)) (2,2 г, выход 45%) в форме белого твердого вещества.

5 (1*s*,4*s*)-4-фенилциклогексан-1-аминия хлорид (*цис*-соединение С·HCl (G= Ph))

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,03 (3H, br, NH₃⁺), 7,34-7,32 (H, m, ArH_{ortho}), 7,31-7,27 (H, m, ArH_{meta}), 7,19-7,17 (H, m, ArH_{para}), 3,42-3,41 (1H, m, CH_{eq}-NH₃⁺), 2,57 (1H, tt, J=11,4 Гц, J=3,4 Гц, CH_{ax}-Ph);

10 ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 146,2 (ArC), 128,2 (ArCH_{meta}), 126,9 (ArCH_{ortho}), 125,9 (ArCH_{para}), 45,8 (CH-NH₃⁺), 41,7 (CH-Ph), 27,8 (CH₂); 26,6 (CH₂);

(1*r*,4*r*)-4-фенилциклогексан-1-аминия хлорид (*транс*-соединение Т·HCl (G= Ph))

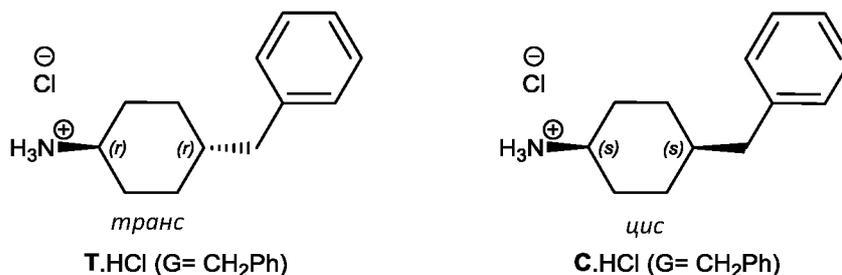
15 ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,03 (3H, br, NH₃⁺), 7,31-7,27 (H, m, ArH_{meta}), 7,24-7,23 (H, m, ArH_{ortho}), 7,19-7,17 (H, m, ArH_{para}), 3,06 (1H, tt, J=11,6 Гц, J=3,9 Гц, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,47 (1H, tt, J=12,0 Гц, J=3,4 Гц, CH_{ax}-Ph);

¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 146,0 (ArC), 128,2 (ArCH_{meta}), 126,6 (ArCH_{ortho}), 126,0 (ArCH_{para}), 48,9 (CH-NH₃⁺), 42,2 (CH-Ph), 31,4 (CH₂); 30,4 (CH₂);

МСВР: М+Н=176,14302 (дельта=-2.0 млн⁻¹; C₁₂H₁₈N). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 159(100); 91(3) и 81(3);

20 ИК (жидкая пленка) ν_{max}: 2939, 2544, 2038, 1610, 1504, 1451, 1390, 1182, 1073, 1020, 758, 700 см⁻¹.

4-бензилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= CH₂Ph))



Реакция 4-бензилциклогексил-1-она (К (G= CH₂Ph)) (1,50 г, 7,97 ммоль) и 10% Pd/C (0,45 г) с формиатом аммония (3,01 г, 47,8 ммоль) в метаноле (60 мл) дала 4-бензилциклогексан-1-амин (соединения Т + С (G=CH₂Ph)) (0,29 г, выход 19%, *цис/транс*=1,00:1,08 (¹H-ЯМР)) в форме жидкости. Затем после подачи газообразного HCl образовался 4-бензилциклогексан-1-аминия хлорид (соединения Т·HCl + С·HCl (G= CH₂Ph)) (0,22 г, выход 12%) в форме белого твердого вещества.

(1*s*,4*s*)-4-бензилциклогексан-1-аминия хлорид (*цис*-соединение С·HCl (G= CH₂Ph))

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,14 (3H, br, NH₃⁺), 7,29-7,25 (2H, m, ArH_{meta}), 7,19-7,13 (3H, m, ArH_{para}, ArH_{orto}), 3,14-3,13 (1H, m, CH-NH₃⁺), 2,55 (2H, d, J=7,64 Гц, CH₂-Ph), 1,78-1,71 (3H, m, 2×CH, CH_{ax}-CH₂Ph), 1,66-1,59 (2H, m, 2×CH), 1,44-1,41 (4H, m, 4×CH);

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 140,6 (ArC), 128,7 (ArC_{orto}), 128,1 (ArC_{meta}), 125,7 (ArC_{para}), 47,6 (CH-NH₃⁺), 39,3 (CH₂-Ph), 35,4 (CH-CH₂-Ph), 26,0 (CH₂), 25,9 (CH₂);

(1*r*,4*r*)-4-бензилциклогексан-1-аминия хлорид (*транс*-соединение Т·HCl (G= CH₂Ph))

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,14 (3H, br, NH₃⁺), 7,29-7,25 (2H, m, ArH_{meta}), 7,19-7,13 (3H, m, ArH_{orto}, ArH_{para}), 2,88 (1H, tt, J=11,8 Гц, J=3,2 Гц, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,45 (2H, d, J=6,9 Гц, CH₂-Ph), 1,93-1,91 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,66-1,59 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,44-1,41 (1H, m, CH_{ax}-CH₂Ph), 1,28 (2H, qd, J=12,61 Гц, J=3,2 Гц, 2×CH_{ax}), 1,00 (2H, qd, J=13,58 Гц, J=2,9 Гц, 2×CH_{ax});

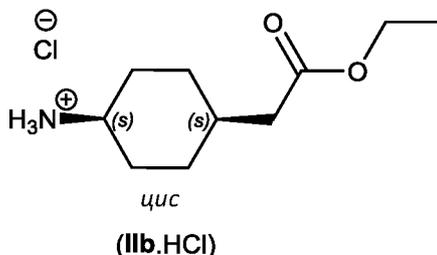
¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 140,3 (ArC), 128,8 (ArC_{orto}), 128,0 (ArC_{meta}), 125,7 (ArC_{para}), 49,3 (CH-NH₃⁺), 42,3 (CH₂-Ph), 37,9 (CH-CH₂Ph), 30,0 (CH₂), 29,9 (CH₂),

МСВР: М+Н=190,15850 (дельта=-2,8 млн⁻¹; C₁₃H₂₀N). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 173(100); 117(2); 105(31); 95(9); 91(5) и 81(2).

ИК (жидкая пленка) ν_{max}: 3073, 2610, 2035, 1610, 1511, 1494, 1453, 1392, 1347, 1203, 1062, 744, 701 см⁻¹.

Цис-диастереомер сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорида (соединение IIb·HCl)

(1*s*,4*s*)-4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (соединение IIb·HCl)



5

Цис-диастереомер сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты гидрохлорида (IIb·HCl с *de* приблизительно 90,2%) получили из остаточного раствора после перекристаллизации диастереомерной смеси гидрохлоридов сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (Ib·HCl + IIb·HCl в соотношении 1:1) из производственного процесса в промышленном масштабе согласно WO2010/070368.

(1*s*,4*s*)-4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорид (*цис*-соединение IIb·HCl)

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,14 (3H, br, NH₃⁺), 4,09-4,02 (2H, m, OCH₂), 3,18-3,09 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,27 (2H, d, J=7,5 Гц, CH₂COOEt), 1,98-1,86 (1H, m, CH_{eq}-CH₂COOEt), 1,69-1,62 (4H, m, 4×CH), 1,53-1,43 (4H, m, 4×CH), 1,18 (3H, t, J=7,2 Гц, CH₃).

15

¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 171,96 (CO), 59,62 (OCH₂), 47,2 (CH-NH₃⁺), 37,92 (CH₂COOEt), 30,58 (CH_{ax}-CH₂COOEt), 25,96 (CH₂), 25,89 (CH₂), 14,04 (CH₃).

ИК (чист.) ν_{max}: 2927, 1727, 1601, 1520, 1511, 1447, 1375, 1226, 1165, 1031 см⁻¹.

20

Трансаминазы различных штаммов микроорганизмов как биокатализаторы

Генерация плазмид и экспрессия (S)-селективной трансаминазы *Chromobacterium violaceum* (CvS-TA) были раскрыты К. Е. Cassimje et al. (ACS Catal. 1(9), 1051–1055 (2011), DOI: 10.1021/cs200315h). Рекомбинантная экспрессия His-меченой мутантной CvS-TA W60C (CvS_{W60C}-TA), проявляющей повышенные каталитические свойства, была опубликована К. Е. Cassimje et al. (Org. Biomol. Chem., 10, 5466-5470 (2012), DOI: 10.1039/C2OB25893E). Рекомбинантная

25

экспрессия His-меченой *VfS*-ТА была раскрыта F. G. Mutti et al. (Eur. J. Org. Chem., 1003–1007 (2012), DOI: 10.1002/ejoc.201101476). Получение и цельноклеточная иммобилизация трех (*R*)- и трех (*S*)-селективных ТА - (*R*)-селективных ТА из *Arthrobacter* sp. (*ArR*-ТА), ее мутированного варианта (*ArR_{mut}*-ТА), ТА из *Aspergillus terreus* (*AtR*-ТА) и (*S*)-селективных ТА из *Arthrobacter citreus* (*ArS*-ТА), мутированного варианта из *Chromobacterium violaceum* (*CvS_{W60C}*-ТА), ТА из *Vibrio fluvialis* (*VfS*-ТА), соответственно, использованных для кинетического разделения рацемических аминов в иммобилизованной цельноклеточной форме, опубликовано Z. Molnár et al. (Catalysts, 9, 438 (2019), DOI: 10.3390/catal9050438). Также был проанализирован Набор для Скрининга Трансаминаз (производства компании Codexis, Редвуд Сити, США), содержащий 24 мутантные аминотрансаминазы (АТА; от англ.: amine transaminase) из двух различных родительских линий: *Vibrio fluvialis* JS17 АТА (*VfS*-ТА: Biotechnol. Bioeng. 65, 206–211 (1999), DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991020)65:2<206::AID-BIT11>3.0.CO;2-9) и *Arthrobacter* sp. АТА (*ArR*-ТА: Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 499–505 (2006), DOI: 10.1007/s00253-005-0002-1). 17 мутаций (отмеченных жирным шрифтом в SEQ ID NO: 3; см. Фиг. 4) в варианте *VfS*-ТА, названном АТА-217, были раскрыты Novick S. J. et al (ACS Catal. 11, 3762–3770 (2021), DOI: 10.1021/acscatal.0c05450).

Экспрессия трансаминаз

Продукция *ArS*-ТА и *VfS*-ТА была достигнута в *E. coli* BL21(DE3), содержащей рекомбинатную рASK-IBA35+ плазмиду с геном данных ТА. Среду LB-Car (5 мл среды Лурия-Бертани (LB; от англ.: Luria-Bertani), содержащей карбенициллин, 50 мг·л⁻¹) инокулировали одной свежей колонией с выдержанного в течение ночи планшета с LB-Car агаром и выращивали клетки в течение ночи во встряхиваемой колбе (37°C, 200 об/мин). LB среду (0,5 л) в колбе объемом 2 л инокулировали посевной культурой (2 мл) и выращивали клетки при 37°C и 200 об/мин до тех пор, пока OD₆₄₀ не достигала 0,8 (примерно 4 часа). Для индукции добавляли раствор тетрациклина (20 мкл, 5 мг·мл⁻¹ тетрациклина в этаноле) и культуру встряхивали в течение следующих 16 часов при 25°C и 200 об/мин. Затем клетки собирали посредством центрифугирования (15000 g, 4°C, 20 мин).

Продукция *AtR*-ТА, *ArR*-ТА, *ArR_{mut}*-ТА и *CvS_{W60C}*-ТА была достигнута в *E. coli* BL21(DE3), содержащей рекомбинатную рЕТ1а плазмиду с геном этих ТА. Среду LB-Car (5 мл среды Лурия-Бертани (LB), содержащей карбенициллин, 50 мг·л⁻¹) инокулировали одной свежей колонией с выдержанного в течение ночи планшета с

LB-Car агаром и выращивали клетки в течение ночи во встряхиваемой колбе (37°C, 200 об/мин). Среду для аутоиндукции (0,5 л; Na₂HPO₄, 6 г·л⁻¹; KH₂PO₄, 3 г·л⁻¹; триптон, 20 г·л⁻¹; экстракт дрожжей, 5 г·л⁻¹; NaCl, 5 г·л⁻¹; глицерол, 7,56 г·л⁻¹; глюкоза, 0,5 г·л⁻¹; лактоза, 2 г·л⁻¹) в колбе объемом 2 л инокулировали посевной культурой (2
5 мл) и встряхивали в течение 16 часов при 25°C и 200 об/мин. Затем клетки собирали посредством центрифугирования (15000 g, 4°C, 20 мин).

Иммобилизация цельных клеток, экспрессирующих трансаминазу

Силиказоль приготовили следующим образом: тетраэтилортосиликат (TEOS; от англ.: tetraethylorthosilicate) (14,4 мл) добавили к раствору, содержащему 0,1M
10 HNO₃ (1,3 мл) и дистиллированную воду (5 мл), и полученную смесь обработали ультразвуком в течение 5 мин при комнатной температуре (ультразвуковая ванна Etag Emmi 20HC, 45 кГц) и выдержали при 4°C в течение 24 часов. Основу MAT540 (3 г) смешали с пастообразной суспензией клеток (6 мл; взята из 1 г центрифугированной клеточной пасты, ресуспендированной в 6 мл 0,1M
15 фосфатного буфера, pH 7) и полученную суспензию интенсивно встряхивали до тех пор, пока она не стала гомогенной (встряхиватель Technokartell Test Tube Shaker Model T3SK, 40 Гц, комнатная температура, 5 мин). В заключение гомогенизированную суспензию клеток с основой смешали с силиказолем и полученную смесь интенсивно встряхивали (встряхиватель Technokartell Test Tube
20 Shaker Model T3SK, 40 Гц, комнатная температура, 5 мин. Гелеобразование произошло за 30 мин при комнатной температуре, после чего гель созрел при 4°C в течение 48 ч в открытом поддоне. Сырой иммобилизованный ТА биокатализатор промыли дистиллированной водой (2x15 мл, 100 мМ, pH 7,5), высушили при комнатной температуре (24 ч) и хранили при 4°C.

Очистка мутантной W60C трансаминазы из Chromobacterium violaceum (CvS_{W60C}-TA)

После ферментации клетки *E. coli*, содержавшие CvS_{W60C}-TA, разрушили прессом Френча, центрифугировали и неочищенный экстракт клеток очистили с использованием смолы Ni-NTA, как описано ранее F. G. Mutti et al. (Eur. J. Org.
30 Chem., 1003–1007 (2012), DOI: 10.1002/ejoc.201101476). Кофактор пиридоксаль-5'-фосфат (PLP; от англ.: pyridoxal-5'-phosphate) добавили к маточным растворам CvS_{W60C}-TA, которые хранили при -20°C в 20%-ном растворе глицерола до дальнейшего использования.

Очистка трансаминазы из Vibrio fluvialis (VfS-TA)

После ферментации клетки *E. coli*, содержавшие VfS-TA, разрушили прессом Френча, центрифугировали и неочищенный экстракт клеток очистили с использованием смолы Ni-NTA, как описано выше для очистки CvS_{W60C}-TA.

5 Кофактор PLP добавили к маточным растворам VfS-TA, которые хранили при -20°C в 20%-ном растворе глицерола до дальнейшего использования.

Активация поверхности аминоэтилполиметакрилатных смол простым диглицидиловым эфиром глицерола (GDE; от англ.: glycerol diglycidyl ether)

Согласно способу E. Abaházi et al. (Biochem. Eng. J. 132, 270-278 (2018), DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.022), этиленамин-функционализированные метакриловые полимерные смолы ReliZyme™ EA403/S (1,0 г, размер частиц 150-300 мкм, размер пор 400-600 Å) добавили к раствору простого диглицидилового эфира глицерола (10 ммоль) в этаноле (15 мл). Суспензию полимерной основы в растворе бисэпоксида встряхивали при 450 об/мин в течение 24 ч при 25°C. Активированную основу отфильтровали на стеклянный фильтр (G3), промыли Patosolv® (3x10 мл), высушили при комнатной температуре (4 ч) и хранили при 4°C в атмосфере аргона.

Иммобилизация CvS_{W60C}-TA на GDE-активированных аминоэтиловых смолах

Согласно способу E. Abaházi et al. (Biochem. Eng. J. 132, 270-278 (2018), DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.022), в пробирке Эппендорфа (1,5 мл) очищенную CvS_{W60C}-TA (210 мкл, 4,8 мг·мл⁻¹) разбавили буфером HEPES (790 мкл, 50 mM, pH 7,0) и затем к раствору добавили GDE-активированную аминоэтиловую смолу (10,0 мг, что привело к отношению фермент:основа = 1:10) Полученную суспензию встряхивали при 900 об/мин в течение 24 ч при 25°C. Иммобилизованную CvS_{W60C}-TA центрифугировали, промыли буфером HEPES (2x10 мл). Концентрации белка в растворе CvS_{W60C}-TA перед иммобилизацией и в супернатанте определили с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Выход иммобилизации (IY; от англ.: immobilization yield) рассчитали согласно уравнению $IY(\%) = (P_0 - P) / P_0 \times 100$ (где P₀ [мг·мл⁻¹] является начальной концентрацией белка перед иммобилизацией, а P [мг·мл⁻¹] является концентрацией белка в супернатанте после иммобилизации). Поскольку после иммобилизации очищенной нативной CvS_{W60C}-TA на GDE-активированной аминоэтиловой смоле (EA-G) можно было обнаружить лишь пренебрежимо малые концентрации белка (P приблизительно 0 мг·мл⁻¹), то выход

иммобилизации при соотношении фермент:основа = 1:10 был приблизительно 100%. После иммобилизации полученный ковалентно иммобилизованный биокатализатор CvS_{W60C} -TA немедленно использовали в реакциях динамической изомеризации.

- 5 Способ иммобилизации удалось масштабировать в десять раз во флаконах объемом 4 мл с идентичными результатами.

Иммобилизация VfS-TA на GDE-активированных аминоэтиловых смолах

Согласно способу E. Abaházi et al. (Biochem. Eng. J. 132, 270-278 (2018), DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.022), в пробирке Эппендорфа (1,5 мл) очищенную VfS-TA (250
10 мкл, 4,5 мг·мл⁻¹) разбавили буфером HEPES (790 мкл, 50 мМ, pH 7,0) и затем к раствору добавили GDE-активированную аминоэтиловую смолу (10,0 мг, что привело к отношению фермент:основа = 1:10) Полученную суспензию встряхивали при 900 об/мин в течение 24 ч при 25°C. VfS-TA центрифугировали, промыли буфером HEPES (2x10 мл). Концентрации белка в растворе VfS-TA перед
15 иммобилизацией и в супернатанте определили с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Был получен выход иммобилизации приблизительно 100% при соотношении фермент:основа = 1:10. После иммобилизации полученный ковалентно иммобилизованный биокатализатор VfS-TA немедленно использовали в реакциях динамической изомеризации.

- 20 *Иммобилизация CvS_{W60C} -TA на GDE-активированных аминоэтиловых смолах в непрерывном потоке*

Согласно способу E. Abaházi et al. (Biochem. Eng. J. 132, 270-278 (2018), DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.022), проточная иммобилизация CvS_{W60C} -TA была выполнена в проточном реакторе лабораторного масштаба, состоявшем из изократического
25 насоса Knauer Azura P4.1S для HPLC, подключенного к колонкам CatCart™, заполненным EA-G, в самодельном алюминиевом металлическом блоке держателя колонок с точным контролем температуры. Раствор CvS_{W60C} -TA (2 мг·мл⁻¹, в объеме, соответствовавшем соотношению фермент:основа = 1:10) рециркулировали в изготовленные из нержавеющей стали колонки CatCart™, заполненные EA-G
30 основой (нержавеющая сталь, внутренний диаметр: 4 мм; общая длина: 70 мм; длина набивки: 65 мм; внутренний объем: 0,816 мл; масса основы: 211,4 ± 16,1 мг), с объемной скоростью, равной 0,5 мл·мин⁻¹. Концентрации белка в растворе CvS_{W60C} -

ТА перед иммобилизацией и в несколько моментов времени во время иммобилизации определили с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000.

Динамическая изомеризация (ДИ) *транс/цис*-диастереомерной смеси сложных этиловых эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (соединения (Ib + IIb) с использованием трансаминазы в периодическом режиме

Пример 1

ДИ *транс/цис*-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием иммобилизованной цельноклеточной *CvS_{W60C}*-ТА в присутствии пирувата в периодическом режиме

Иммобилизованный цельноклеточный мутантный W60C трансаминазный биокатализатор из *Chromobacterium violaceum* (*CvS_{W60C}*-ТА, 50 мг) суспендировали в фосфатном буфере (1,6 мл, 100 мМ, рН 7,5) во флаконах объемом 4 мл. *Цис/транс*-диастереомерную смесь гидрохлоридной соли сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты [соединения IIb·HCl и Ib·HCl, в соотношении 44:56; 11,1 мг, 50 мкмоль, в фосфатном буфере (200 мкл, 100 мМ, рН 7,5)] и пируват натрия в качестве акцептора аминогруппы [0,5 экв., 0,23 мг, 25 мкмоль, в фосфатном буфере (200 мкл, 100 мМ, рН 7,5)] добавили к суспензии биокатализатора с получением конечного реакционного объема, равного 2 мл, с 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси (IIb·HCl/Ib·HCl). Реакционную смесь встряхивали на орбитальном шейкере (500 об/мин) при 30°C в течение 24 ч. К образцам, взятым из реакционной смеси (150 мкл), добавили гидроксид натрия (100 мкл, 1 М) с последующей экстракцией этилацетатом (800 мкл). Дериватизацию аминов выполнили посредством добавления уксусного ангидрида (20 мкл, 60°C, 1 ч), затем органическую фазу высушили над Na₂SO₄. Образцы проанализировали посредством газовой хроматографии.

Согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 76,3%, 0,6% и 23%, соответственно.

Реакционную смесь центрифугировали для удаления биокатализатора. Водный супернатант подкислили посредством добавления водной концентрированной HCl до рН 1 и экстрагировали его дихлорметаном (3x3 мл). Объединенные органические фазы промыли насыщенным рассолом (3 мл), высушили над безводным Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме с получением кетона (соединение IIIb: 2,0 мг, 11 мкмоль, выход 95%). рН подкисленной водной

фазы довели до pH 10 посредством добавления 25%-ного водного раствора гидроксида аммония и щелочной раствор экстрагировали дихлорметаном (3x3 мл). Объединенные органические фазы промыли насыщенным рассолом (3 мл), высушили над безводным Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме с получением

5 *транс*-амина (соединение Ib: 4,8 мг, 26 мкмоль, выход 68% с $de_{trans} = 98,3\%$ по результатам GC).

Пример 2

ДИ транс-цис-этиловых эфиров (Ib+IIb) с использованием иммобилизованной цельноклеточной VfS-TA в присутствии пирувата в периодическом режиме

10 Процедура провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован иммобилизованный цельноклеточный трансаминазный биокатализатор из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA, 50 мг).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные

15 фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 70,6%, 1,5% и 27,9%, соответственно.

Пример 3

ДИ транс-цис-этиловых эфиров (Ib+IIb) с использованием удвоенного количества иммобилизованной цельноклеточной VfS-TA в присутствии пирувата в

20 периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован иммобилизованный цельноклеточный трансаминазный биокатализатор из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA, 100 мг).

По истечении времени реакции, равного 6 часам, согласно интеграции

25 площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 74,5%, 1,0% и 24,5%, соответственно.

Пример 4ДИ транс/цис-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием очищенной растворимой CvS_{W60C}-ТА в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован очищенный Ni-NTA мутантный W60C трансминазный биокатализатор из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-ТА, 50 мг) в растворе (с концентрацией белка, равной 0,5 мг/мл в конечной реакционной смеси, с добавлением 0,2 мМ пиридоксаль-5-фосфата (PLP)) в реакции, начатой от 25 мМ цис/транс-диастереомерной смеси (IIb·HCl/Ib·HCl = 44:56).

По истечении времени реакции, равного 2 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 86,0%, 0% и 14,0%, соответственно.

Экстракционная процедура, представленная в Примере 1, дала кетон (соединение IIIb: 1,3 мг, 7 мкмоль, выход приблизительно 98%) и транс-амин (соединение Ib: 4,9 мг, 27 мкмоль, выход 62% с $de_{trans} > 99\%$ по результатам GC).

Пример 5ДИ транс/цис-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием очищенной растворимой VfS-ТА в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован очищенный Ni-NTA трансминазный биокатализатор из *Vibrio fluvialis* (VfS-ТА) (с концентрацией белка, равной 0,5 мг/мл в конечной реакционной смеси, с добавлением 0,2 мМ пиридоксаль-5-фосфата (PLP)) в реакции, начатой от 25 мМ цис/транс-диастереомерной смеси (IIb·HCl/Ib·HCl = 51:49).

По истечении времени реакции, равного 3 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 79,0%, 0,5% и 20,5%, соответственно.

Экстракционная процедура, представленная в Примере 1, дала кетон (соединение IIIb: 1,7 мг, приблизительно 9 мкмоль, выход приблизительно 92%) и

транс-амин (соединение Ib: 4,8 мг, 26 мкмоль, выход 65% с $de_{trans} > 98,7\%$ по результатам GC).

Пример 6

5 ДИ транс/цис-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием Vfs-TA, ковалентно
иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в периодическом
режиме

10 Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что в качестве биокатализатора была использована ковалентно иммобилизованная на полимерной смоле трансаминаза из *Vibrio fluvialis* (Vfs-TA, 10 мг).

По истечении времени реакции, равного 6 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 74,9%, 1,6% и 23,6%, соответственно.

15 Пример 7

ДИ транс/цис-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием иммобилизованной
цельноклеточной Vfs-TA в присутствии кетона (IIIb) в периодическом режиме

20 Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что в реакции были использованы иммобилизованная цельноклеточная трансаминаза из *Vibrio fluvialis* (Vfs-TA, 50 мг) в качестве биокатализатора и этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат (соединение IIIb, 2,5 мМ) в качестве акцептора аминогруппы.

25 По истечении времени реакции, равного 48 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 74,6%, 12,4% и 13,0%, соответственно.

Пример 8ДИ транс/цис-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием очищенной растворимой VfS-TA в присутствии кетона (IIIb) в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что были использованы этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат (соединение IIIb, 2,5 мМ) в качестве акцептора аминогруппы и очищенный Ni-NTA трансаминазный биокатализатор из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA) (с концентрацией белка, равной 0,5 мг/мл, в конечной реакционной смеси, с добавлением 0,2 мМ пиридоксаль-5-фосфата (PLP)) в реакции, начатой от 25 мМ цис/транс-диастереомерной смеси (IIb·HCl/Ib·HCl = 51:49).

По истечении времени реакции, равного 48 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 78,4%, 10,8% и 10,7%, соответственно.

Экстракционная процедура, представленная в Примере 1, дала кетон (соединение IIIb: 1,0 мг, приблизительно 5,4 мкмоль, выход приблизительно 97%) и неочищенный транс-амин (соединение Ib с малым количеством IIb: 6,2 мг, 33 мкмоль, выход 66% с $de_{trans}=75,7\%$ по результатам GC).

Перекристаллизация неочищенного транс-амин (соединение Ib с малым количеством IIb) согласно способу, раскрытому в WO2010/070368, дала гидрохлоридную соль транс-амин (соединение Ib·HCl: 5,7 мг, 26 мкмоль, с $de_{trans}>99\%$ по результатам GC).

Пример 9ДИ транс/цис-этиловых эфиров (Ib + IIb) с использованием очищенной растворимой VfS-TA в присутствии циклогексанона в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что были использованы циклогексанон (5 мМ) в качестве акцептора аминогруппы и очищенный Ni-NTA трансаминазный биокатализатор из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA) (с концентрацией белка, равной 0,5 мг/мл, в конечной реакционной смеси, с добавлением 0,2 мМ пиридоксаль-5-фосфата (PLP)) в реакции, начатой от 25 мМ цис/транс-диастереомерной смеси (IIb·HCl/ Ib·HCl = 51:49).

По истечении времени реакции, равного 48 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 85,9%, 9,3% и 4,8%, соответственно.

- 5 Экстракционная процедура, представленная в Примере 1, дала кетон (соединение IIIb с малым количеством циклогексанона: 0,4 мг) и неочищенный *транс*-амин (соединение Ib с малым количеством IIb: 6,1 мг, 32 мкмоль, выход 64% с $de_{trans}=80,4\%$ по результатам GC).

10 **Динамическая изомеризация (ДИ) *транс/цис*-диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (соединения С+Т) ковалентно иммобилизованной мутантной W60C трансаминазой из *Chromobacter violaceum* в режиме непрерывного потока**

Пример 10

15 ДИ *транс/цис*-этиловых эфиров (Ib-HCl + IIb-HCl) с использованием CvS_{W60C}-ТА, ковалентно иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в режиме непрерывного потока

Динамическую изомеризацию *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорида (соединения Ib-HCl + IIb-HCl) выполнили в проточном реакторе лабораторного масштаба, содержащем шприцевой насос (Asia[®] Syringe Pump system, производства компании Syrris Ltd., Ройстон, СК), присоединенный к колонкам SynBioCart (производства компании SynBiocat, Будапешт, Венгрия; наружная трубка из нержавеющей стали и внутренняя трубка из политетрафторэтилена (PTFE; от англ.: polytetrafluoroethylene), внутренний диаметр: 4 мм; общая длина: 70 мм; длина набивки: 65 мм; внутренний объем: 0,816 мл).
 20 Колонка была уплотнена фильтровальными мембранами, изготовленными из PTFE [Whatman[®] Sigma-Aldrich, WHA10411311, размер пор 0,45 мкм]. Уплотнительные элементы были изготовлены из PTFE. Трубку из PTFE (наружный диаметр 1/16" и внутренний диаметр 0,8 мм, производства компании VICI AG International, Шенкон, Швейцария) и фитинг из полиэфирэфиркетона (PEEK; от англ.: polyetheretherketone)
 25 (производства компании Sigma Aldrich) использовали для соединения колонок (закуплены у коммерческих поставщиков). Три последовательно соединенные колонки SynBioCart, заполненные ковалентно иммобилизованным биокатализатором CvS_{W60C}-ТА (массы наполнителя: 375±12 мг/колонку),
 30

иммобилизованным на метакриловых полимерных смолах (ReliZyme™ EA403/S; полиметилметакрилатные основы, размер частиц 150-300 мкм, размер пор 400-600 Å), модифицированных простым глицерол-1,3-диглицидиловым эфиром, термостатировали при 40°C с точным контролем температуры в самодельном
 5 металлическом блоке, изготовленном из нержавеющей стали. Колонки, заполненные биокатализатором CvS_{W60C}-TA, предварительно промывали буфером HEPES (50 мМ, рН=7,0) в течение 1 часа. Затем раствор *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-(2-этокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорида [соединения Ib·HCl + IIb·HCl, *цис/транс*=69,7:30,3, 20 мМ, растворенные в буфере
 10 HEPES (50 мМ, рН=7,0), содержащем ДМСО в качестве соразтворителя (10 об. %), пируват натрия (0,95 экв.) и PLP (1%)] прокачивали через колонку с объемной скоростью, равной 10 мкл·мин⁻¹. После установления стационарной работы (приблизительно 6 ч) каждый час во время периода стационарной работы отбирали образцы и анализировали их посредством GC, а вытекающие продукты реакции
 15 собирали в течение 48 часов.

Собранный раствор (25 мл) подкислили водной концентрированной HCl до рН 1 и образовавшийся кетон (соединение IIIb) удалили посредством экстракции дихлорметаном (3x50 мл). После удаления кетона водную фазу подщелочили посредством добавления гидроксида аммония (25%) до рН 12 и остаточный амин
 20 экстрагировали дихлорметаном (3x50 мл). Объединенную органическую фазу экстрагировали насыщенным рассолом (30 мл), высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом с получением продукта – амина (соединение Ib), который растворили в простом диэтиловом эфире и обработали газообразным HCl. Осадок затем выделили посредством фильтрации и высушили с получением
 25 продукта – гидрохлоридной соли *транс*-амина (соединение Ib·HCl, 11,6 мг, фактический выход 27%, *de_{trans}*>99%) в форме белого твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,09 (3H, br, NH₃⁺), 4,04 (2H, q, J=7,22 Гц, OCH₂), 2,94-2,83 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,17 (2H, d, J=7,0 Гц, CH₂-COOEt), 1,93 (2H, br d, J=13,5 Гц, 2×CH_{eq}CHNH₃⁺), 1,72 (2H, br d, J=13,0 Гц, 2×CH_{eq}), 1,64-1,56 (1H, m, CH_{ax}-CH₂COOEt), 1,32 (2H, qd, J=12,4 Гц, J=2,9 Гц, 2×CH_{ax}-CHNH₃⁺), 1,17 (3H, t, J=7,2 Гц, CH₃), 1,02 (2H, qd, J=12,8 Гц, J=2,7 Гц, 2×CH_{ax});
 30

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 171,8 (CO), 59,6 (OCH₂), 48,9 (CH-NH₃⁺), 40,4 (CH₂-COOEt), 33,1 (CH₂), 29,8 (2×CH₂), 14,0 (CH₃);

МСВР: $M^+ = 200,16443$ (дельта = $-0,4$ млн⁻¹; $C_{11}H_{22}O_2N$). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 183(41) и 141(100).

Пример 11

5 ДИ сложных транс/цис-изопропиловых эфиров (Id·HCl + IId·HCl) с использованием CvS_{W60C} -ТА, ковалентно иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в режиме непрерывного потока

Процедуру провели так, как показано в Примере 10, с модификацией, состоявшей в том, что четыре последовательно соединенные колонки SynBioCart, заполненные ковалентно иммобилизованным CvS_{W60C} -ТА биокатализатором, использовали для динамической изомеризации *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-(2-изопропокси-2-оксоэтил)циклогексан-1-аминия хлорида (соединения Id·HCl + IId·HCl, 20 мМ, *цис:транс*=51,7:48,3). Стационарный режим реакции в течение 48 часов дал продукт – гидрохлоридную соль *транс*-амина (соединение Id·HCl, 18,7 мг, фактический выход 30%, $de_{trans} > 99\%$) в форме белого твердого вещества.

15 ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,05 (3H, br, NH₃⁺), 4,88 (1H, quint, J=6,3 Гц, CH-(CH₃)₂), 2,89-2,87 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,14 (2H, d, J=6,96 Гц, CH₂-COOⁱPr), 1,94-1,91 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,72-1,70 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,63-1,55 (1H, m, CH_{ax}-CH₂COOⁱPr), 1,32 (2H, qd, J=12,7 Гц, J=3,0 Гц, 2×CH_{ax}), 1,17 (6H, d, J=6,25 Гц, 2×CH₃), 1,02 (2H, qd, J=12,9 Гц, J=3,1 Гц, 2×CH_{ax});

20 ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 171,3 (CO), 66,9 (CH-(CH₃)₂), 48,9 (CH-NH₃⁺), 40,6 (CH-CH₂-COOⁱPr), 33,2 (CH-CH₂COOⁱPr), 29,8 (CH₂), 29,7 (CH₂), 21,5 (CH₃);

МСВР: $M^+ = 186,14866$ (дельта = $-1,1$ млн⁻¹; $C_{10}H_{20}O_2N$). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 169(100).

Пример 12

25 ДИ транс/цис-4-метилциклогексан-1-аминия хлорида (C·HCl + T·HCl (G=H)) с использованием CvS_{W60C} -ТА, ковалентно иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в режиме непрерывного потока

Процедуру провели так, как показано в Примере 10, с модификацией, состоявшей в том, что четыре последовательно соединенные колонки SynBioCart, заполненные ковалентно иммобилизованным CvS_{W60C} -ТА биокатализатором, использовали для динамической изомеризации *цис/транс*-диастереомерной смеси

4-метилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·НСI + Т·НСI (G=H), 20 мМ, *цис:транс*=42:58). Стационарный режим реакции в течение 24 часов дал *транс*-амин (соединение Т (G=H)) с $de_{trans}>99\%$ (по результатам GC), который не был выделен вследствие летучести продукта.

5

Пример 13

ДИ *транс/цис*-4-этилциклогексан-1-аминия хлорида (С·НСI + Т·НСI (G=Me)) с использованием CvS_{W60C}-ТА, ковалентно иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в режиме непрерывного потока

Процедуру провели так, как показано в Примере 10, с модификацией, состоявшей в том, что две последовательно соединенные колонки SynBioCart, 10 заполненные ковалентно иммобилизованным CvS_{W60C}-ТА биокатализатором, использовали для динамической изомеризации *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-этилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·НСI + Т·НСI (G=Me), 20 мМ, *цис:транс*=65,4:34,6). Стационарный режим реакции в течение 24 часов (6-24 часа) 15 дал продукт в форме гидрохлоридной соли *транс*-амина (соединение С·НСI + Т·НСI (G=Me), 10,7 мг, фактический выход 30,4%, $de_{trans}>99\%$) в форме белого твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 7,99 (3H, br, NH₃⁺), 2,91-2,86 (1H, m CH_{ax}-NH₃⁺), 1,93-1,92 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,75-1,74 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,31-1,23 (2H, qd, J=12,6 Гц, J=3,25 Гц, 2×CH_{ax}), 1,21-1,16 (2H, quint, J=15 Гц, CH₂CH₃), 1,07-1,03 (1H, m, CH_{ax}-CH₂CH₃), 0,94-0,88 (2H, qd, J=12,9 Гц, J=3,3 Гц, 2×CH_{ax}), 0,86-0,83 (3H, t, J=7,5 Гц, CH₂CH₃);

¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 49,42 (CH- NH₃⁺), 37,49 (CH-CH₂CH₃), 30,07 (CH₂), 29,92 (CH₂- CHCH₂CH₃), 28,69 (CH₂CH₃), 11,27 (CH₂CH₃);

25 MSBP: M⁺=128,14307 (дельта=-2,4 млн⁻¹; C₈H₁₈N). BP-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 111(100) и 69(10).

Пример 14

ДИ транс/цис-4-фенилциклогексан-1-аминия хлорида (С·НСI + Т·НСI (G=Ph)) с использованием CvS_{W60C}-ТА, ковалентно иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в режиме непрерывного потока

5 Процедуру провели так, как показано в Примере 10, с модификацией, состоявшей в том, что две последовательно соединенные колонки SynBioCart, заполненные ковалентно иммобилизованным CvS_{W60C}-ТА биокатализатором, использовали для динамической изомеризации *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-фенилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·НСI + Т·НСI (G=Ph), 15 мМ, *цис:транс*=26,2:73,8). Стационарный режим реакции в течение 24 часов (6-24 часа) дал продукт в форме гидрохлоридной соли *транс*-амина (соединения С·НСI + Т·НСI (G=Ph), 26,7 мг, фактический выход 70,7%) в форме желтовато-белого твердого вещества.

15 ¹Н ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,17 (3H, br, NH₃⁺), 7,29-7,26 (2H, m, ArH_{meta}), 7,24-7,22 (2H, m, ArH_{ortho}), 7,18 (1H, tt, J=7,11 Гц, J=1,43 Гц, ArH_{para}), 3,05-3,03 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,46-2,40 (1H, m, CH_{ax}-Ph), 2,06-2,04 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,83-1,82 (2H, m, 2×CH_{eq}); 1,57-1,44 (4H, m, 4×CH_{ax});

¹³С ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_C: 146,0 (ArC), 128,2 (ArCH_{meta}), 126,6 (ArCH_{ortho}), 126,0 (ArCH_{para}), 48,8 (CH-NH₃⁺), 42,2 (CH-Ph), 31,4 (CH₂), 30,4 (CH₂);

20 МСВР: M⁺=176,14312 (дельта=-1,5 млн⁻¹; C₁₂H₁₈N). ВР-ЭРИ-МС-МС (CID=35%; отн. инт. %): 159(100); 91(3) и 81(3).

Пример 15

ДИ транс/цис-4-бензилциклогексан-1-аминия хлорида (С·НСI + Т·НСI (G=CH₂Ph)) с использованием CvS_{W60C}-ТА, ковалентно иммобилизованной на пористой смоле, в присутствии пирувата в режиме непрерывного потока

25 Процедуру провели так, как показано в Примере 10, с модификацией, состоявшей в том, что одну колонку SynBioCart, заполненную ковалентно иммобилизованным CvS_{W60C}-ТА биокатализатором, использовали для динамической изомеризации *цис/транс*-диастереомерной смеси 4-бензилциклогексан-1-аминия хлорида (соединения С·НСI + Т·НСI (G=CH₂Ph), 15 мМ, *цис:транс*=50,7:49,3). Стационарный режим реакции в течение 24 часов (6-24 часа) дал продукт в форме

гидрохлоридной соли *транс*-амина (соединение С·HCl + Т·HCl (G=CH₂Ph), 19,8 мг, фактический выход 54,1%) в форме желтовато-белого твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ_H: 8,17 (3H, br, NH₃⁺), 7,29-7,26 (2H, m, ArH_{meta}), 7,24-7,22 (2H, m, ArH_{ortho}), 7,18 (1H, tt, J=7,11 Гц, J=1,43 Гц, ArH_{para}), 3,05-3,03 (1H, m, CH_{ax}-NH₃⁺), 2,46-2,40 (1H, m, CH_{ax}-Ph), 2,06-2,04 (2H, m, 2×CH_{eq}), 1,83-1,82 (2H, m, 2×CH_{eq}); 1,57-1,44 (4H, m, 4×CH_{ax}).

Динамическая изомеризация *цис/транс*-диастереомерных смесей 4-замещенных циклогексан-1-аминов с использованием АТА-217 (генно-инженерная Vfs-TA) в периодическом режиме

10

Пример 16

ДИ *транс/цис*-метиловых сложных эфиров (Ia+IIa) с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси (IIa·HCl/Ia·HCl = 48:52) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, pH 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIa) и соответствующих ацетамидов Ia и IIa, молярные фракции продуктов Ia, IIa и IIIa в смеси составили 76,9%, 19,2% и 3,9%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 24,7%, и $de_{trans}=60,1\%$ по результатам GC.

Пример 17

25

ДИ *транс/цис*-этиловых сложных эфиров (Ib+IIb) с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси (IIb·HCl/Ib·HCl = 49:51) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, pH 7,5) с добавлением

30

пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 84,6%, 11,3% и 4,0%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 34,0%, и $de_{trans}=76,4\%$ по результатам GC.

Пример 18

10 ДИ *цис*-этилового сложного эфира (IIb) с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис*-диастереомера (IIb·HCl, $de_{cis}=90,2\%$) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, pH 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

20 По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIb) и соответствующих ацетамидов Ib и IIb, молярные фракции продуктов Ib, IIb и IIIb в смеси составили 84,2%, 11,4% и 4,4%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 79,3%, и $de_{trans}=76,0\%$ по результатам GC.

Пример 19

25 ДИ *транс/цис*-изопропиловых сложных эфиров (Id+IId) с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси (IId·HCl/Id·HCl = 69:31) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, pH 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IIIId) и соответствующих ацетамидов Id и IIId, молярные фракции продуктов Id, IIId и IIIId в смеси составили 84,4%, 10,9% и 4,7%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 53,4%, и $de_{trans}=77,2\%$ по результатам GC.

Пример 20

Попытка изомеризации транс/цис-2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола (IVa + Va) с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси (Va/IVa = 48,3:51,7) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, pH 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (VIa) и соответствующих ацетамидов IVa и Va, молярные фракции продуктов IVa, Va и VIa в смеси составили 49,8%, 31,0% и 19,2%, соответственно, что показывает фактическое отсутствие конверсии *цис* в *транс*, но $de_{trans}=23,2\%$ по результатам GC.

Пример 21

ДИ транс/цис-4-(2-ацетоксиэтил)циклогексан-1-амина [соединения IV (R=AC) + V (R+Ac)] с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси О-ацетата (V(R=AC) · HCl/IV(R=AC) · HCl=52,9:47,1) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, pH 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона [VI (R=Ac)] и соответствующих ацетамидов IV (R=Ac) и V (R=Ac), молярные фракции продуктов IV (R=Ac), V (R=Ac) и VI (R=Ac) в смеси составили 59,4%, 33,2% и 7,4%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 12,3%, и $de_{trans}=28,3\%$ по результатам GC.

Пример 22

ДИ транс/цис-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амина (соединения VIIa + VIIIa) с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

10 Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси О-ацетата (VIIa/VIIIa=52,0:48,0) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, рН 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04 экв., 1
15 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона (IXa) и соответствующих ацетамидов VIIa и VIIIa, молярные фракции продуктов VIIa, VIIIa и IXa в смеси составили 74,9%, 11,7% и 13,4%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 22,9%, и
20 $de_{trans}=73,0\%$ по результатам GC.

Пример 23

ДИ транс/цис-4-((1,3-диоксан-2-ил)метил)циклогексан-1-амина [соединения VII (n=2) + VIIIa (n=2)] с использованием лиофилизированной АТА-217 в присутствии пирувата в периодическом режиме

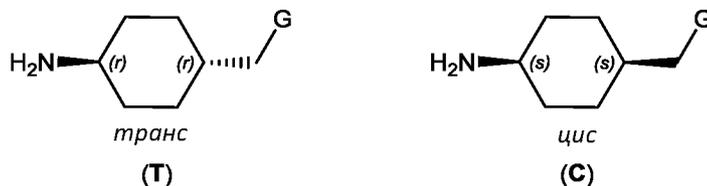
25 Процедуру провели так, как показано в Примере 1, с модификацией, состоявшей в том, что был использован биокатализатор АТА-217 (в концентрации, равной 1,0 мг/мл) в реакции, начатой от 25 мМ *цис/транс*-диастереомерной смеси О-ацетата (VII (n=2)/VIII (n=2)=51,0:49,0) в натрийфосфатном буфере (100 мМ, рН 7,5) с добавлением пиридоксаль-5-фосфата (PLP, 0,1 мМ) и пирувата натрия (0,04
30 экв., 1 мМ) в качестве акцептора аминогруппы к конечной реакционной смеси (2 мл).

По истечении времени реакции, равного 24 часам, согласно интеграции площадей пиков для кетона [IXa (n=2)] и соответствующих ацетамидов VII (n=2) и

VIII (n=2), молярные фракции продуктов VII (n=2), VIII (n=2) и IX (n=2) в смеси составили 60,9%, 27,3% и 11,7%, соответственно, что показывает конверсию *цис* в *транс*, равную 9,9%, и $de_{trans}=38,0\%$ по результатам GC.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

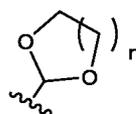
1. Способ получения (1*r*,4*r*)-4-замещенного циклогексан-1-амина [*транс*-4-замещенного циклогексан-1-амина] формулы (Т), исходя из диастереомерной смеси 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (С) + формула (Т))

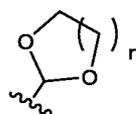


5

или любой их соли, причем в формуле (Т) и в формуле (С) G обозначает заместитель, выбранный из

- атома водорода;
- C₁₋₆ алкильной группы;
- 10 - сложноэфирного фрагмента (-COOR), где R представляет собой подходящую алкильную, араalkильную или арильную группу, предпочтительно – C₁₋₆ алкильную группу, более предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп;
- группы CH₂-OR', где R' представляет собой атом водорода или защитную
- 15 группу для гидроксила;



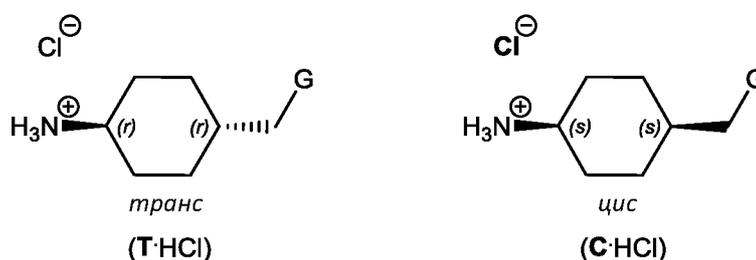
- защищенной альдегидной группы формулы , где n является целым числом от 1 до 2;
- замещенной или незамещенной арильной группы, предпочтительно – фенильной группы; или
- 20 - араalkильной группы, предпочтительно – бензильной группы,

причем диастереомерная смесь реагирует с одним трансаминазным биокатализатором в цельноклеточной, растворимой или иммобилизованной форме в присутствии акцептора аминогруппы, используемого в количествах от субэквимольного до эквимольного.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию проводят в периодическом режиме или в режиме непрерывного потока.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что исходная диастереомерная смесь 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (C) + формула (T)) находится в форме свободного основания.

4. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что исходная диастереомерная смесь 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (C) + формула (T)) находится в форме соли, предпочтительно – в форме гидрохлоридной соли (формула (C·HCl) + формула (T·HCl)).



10

5. Способ по любому из пунктов с 1 по 4, отличающийся тем, что исходная диастереомерная смесь 4-замещенных циклогексан-1-аминов (формула (C) + формула (T)) или ее солевая форма содержит *цис/транс*-изомеры в соотношении от примерно 2:98 до примерно 99:1.

6. Способ по любому из пунктов с 1 по 5, отличающийся тем, что в нем используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 37%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

20

7. Способ по любому из пунктов с 1 по 6, отличающийся тем, что в нем используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 40%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

25

8. Способ по любому из пунктов с 1 по 7, отличающийся тем, что в нем используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по

меньшей мере примерно 50%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

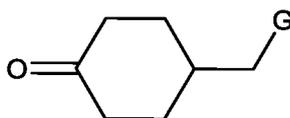
5 9. Способ по любому из пунктов с 1 по 8, отличающийся тем, что в нем используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 60%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по
10 меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

 10. Способ по любому из пунктов с 1 по 9, отличающийся тем, что в нем используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 75%-ной идентичностью последовательности мутантной трансаминазы (W60C) из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) или
15 трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

 11. Способ по любому из пунктов с 1 по 10, отличающийся тем, что в нем используют трансаминазу, содержащую последовательность аминокислот с по меньшей мере примерно 90%-ной идентичностью последовательности мутантной
20 трансаминазы (W60C) из *Chromobacterium violaceum* (CvS_{W60C}-TA: SEQ ID NO: 1) или трансаминазы из *Vibrio fluvialis* (VfS-TA: SEQ ID NO: 2) в области, содержащей по меньшей мере примерно 100 остатков аминокислот.

 12. Способ по любому из пунктов с 1 по 11, отличающийся тем, что в нем используют подходящий кетон или альдегид в качестве соединения, являющегося
25 акцептором аминогруппы, в субэквимолярных количествах.

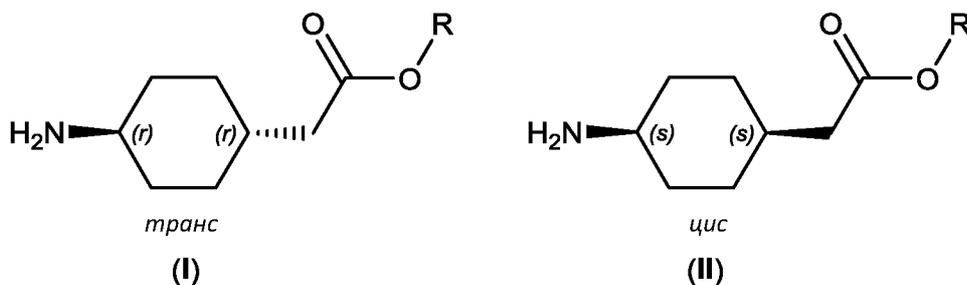
 13. Способ по любому из пунктов с 1 по 12, отличающийся тем, что 4-замещенный циклогексанон формулы К



(K)

где G является таким, как описано в пункте 1 для формулы (C) и формулы (T), используют в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы.

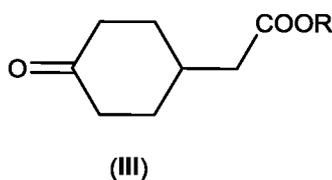
14. Способ по любому из пунктов с 1 по 13, отличающийся тем, что исходная диастереомерная смесь состоит из сложных эфиров 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты формулы (I) и формулы (II)



- где R представляет собой подходящую алкильную, аралкильную или арильную группу, предпочтительно – C₁₋₆-алкильную группу, более предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп, в форме свободного основания или в форме соли.

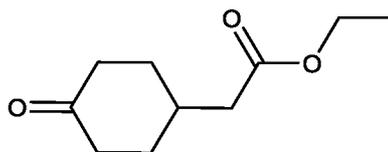
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют пируват натрия в субэквимольных количествах.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют 4-замещенный циклогексанон формулы (III)



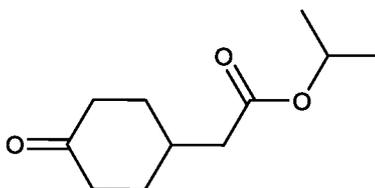
- в которой R представляет собой такую же подходящую алкильную, аралкильную или арильную группу, предпочтительно – такую же C₁₋₆-алкильную группу, более предпочтительно – заместитель, выбранный из метильной, этильной, пропильной и изопропильной групп.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют этил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат формулы (IIIb).



(IIIb)

18. Способ по п. 16, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют изопропил-2-(4-оксоциклогексил)ацетат формулы (IIIb)



(IIIc)

5

19. Способ по любому из пунктов с 14 по 18, отличающийся тем, что мутантный (W60C) фермент из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 1/ используют в качестве трансаминазы в периодическом режиме.

10 20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 1/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

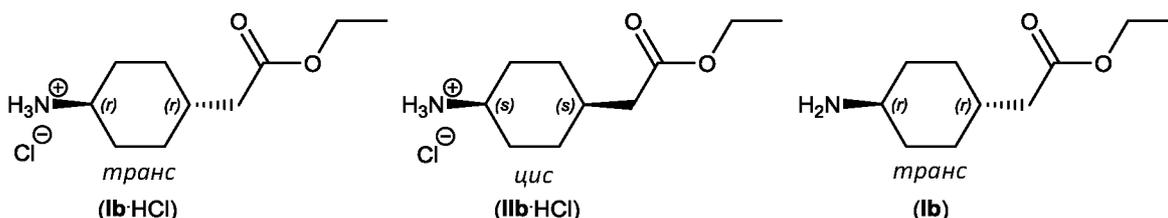
15 21. Способ по любому из пунктов с 14 по 18, отличающийся тем, что фермент из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 2/ используют в качестве трансаминазы в периодическом режиме.

20 22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что трансаминазу из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 2/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

23. Способ по любому из пунктов с 14 по 18, отличающийся тем, что *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ используют в режиме непрерывного потока.

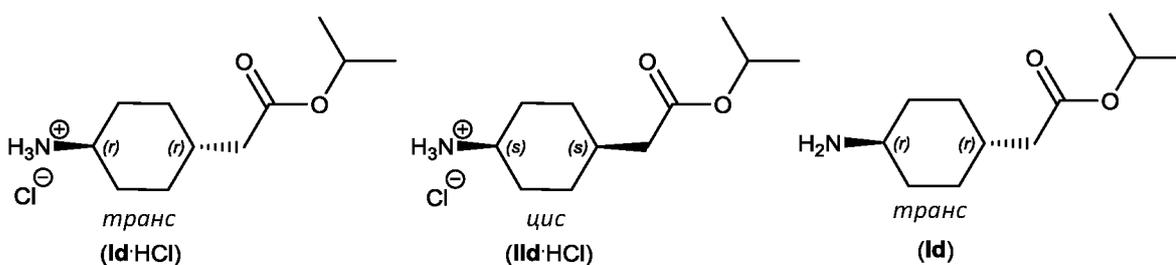
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что в нем используют *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ с ковалентной иммобилизацией на пористой полимерной основе.

25. Способ по любому из пунктов с 14 по 24, отличающийся тем, что, исходя из диастереомерной смеси гидрохлоридной соли сложного этилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib·HCl + формула IIb·HCl), получают чистый сложный этиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Ib).



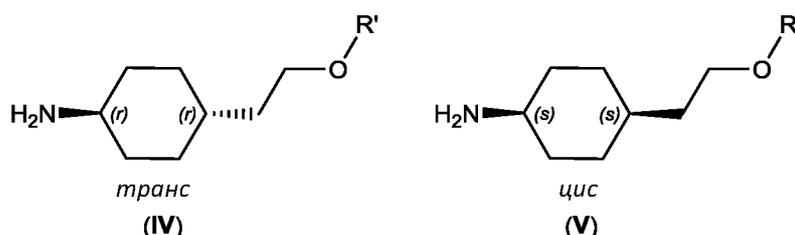
10

26. Способ по любому из пунктов с 14 по 24, отличающийся тем, что, исходя из диастереомерной смеси гидрохлоридной соли сложного изопропилового эфира 2-(4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Id·HCl + формула IIId·HCl), получают чистый сложный изопропиловый эфир 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)уксусной кислоты (формула Id).



15

27. Способ по любому из пунктов с 1 по 13, отличающийся тем, что исходная диастереомерная смесь состоит из производных 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола формулы (IV) и формулы (V)

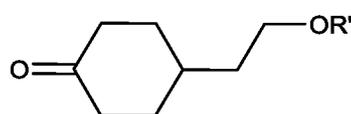


20

где R' представляет собой атом водорода или подходящую защитную группу для гидроксила, предпочтительно – бензильную группу, в форме свободного основания или в форме соли.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют пируват натрия в субэквимольных количествах.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют 4-замещенный циклогексанон формулы (VI)

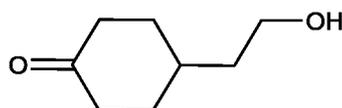


(VI)

10

в которой R' представляет собой такой же атом водорода или подходящую защитную группу для гидроксила, предпочтительно – бензильную группу.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют 2-(4-оксоциклогексил)этан-1-ол формулы (VIa).



(VIa)

15

31. Способ по любому из пунктов с 27 по 30, отличающийся тем, что мутантный (W60C) фермент из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 1/ используют в качестве трансаминазы в периодическом режиме.

20

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 1/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

25

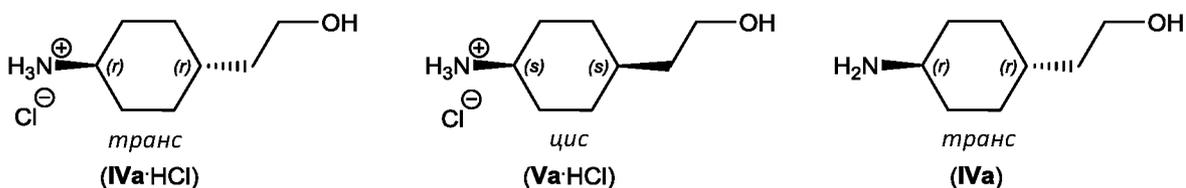
33. Способ по любому из пунктов с 27 по 30, отличающийся тем, что фермент из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 2/ используют в качестве трансминазы в периодическом режиме.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что трансминазу из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 2/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

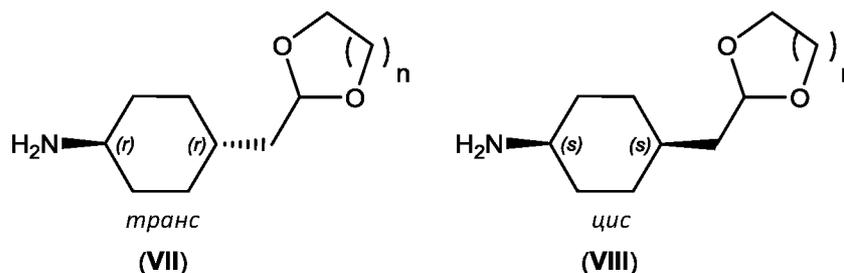
35. Способ по любому из пунктов с 27 по 30, отличающийся тем, что *цис*-селективную мутантную (W60C) трансминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ используют в режиме непрерывного потока.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что в нем используют *цис*-селективную мутантную (W60C) трансминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ с ковалентной иммобилизацией на пористой полимерной основе.

37. Способ по любому из пунктов с 27 по 36, отличающийся тем, что, исходя из диастереомерной смеси гидрохлоридной соли 2-(4-аминоциклогексил)этан-1-ола (формула IVa·HCl + формула Va·HCl), получают чистый 2-(*транс*-4-аминоциклогексил)этан-1-ол (формула IVa).



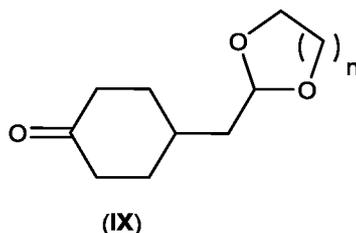
38. Способ по любому из пунктов с 1 по 13, отличающийся тем, что исходная диастереомерная смесь состоит из производных 2-(4-аминоциклогексил)ацетальдегида формулы (VII) и формулы (VIII)



где n является целым числом от 1 до 2.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют пируват натрия в субэквимольных количествах.

40. Способ по п. 38, отличающийся тем, что в качестве кетона, являющегося акцептором аминогруппы, используют 4-замещенный циклогексанон формулы (IX)



где n представляет собой целое число от 1 до 2.

41. Способ по любому из пунктов с 38 по 40, отличающийся тем, что мутантный (W60C) фермент из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 1/ используют в качестве трансаминазы в периодическом режиме.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 1/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

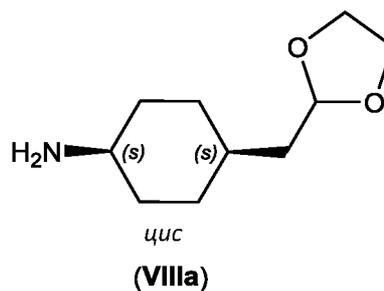
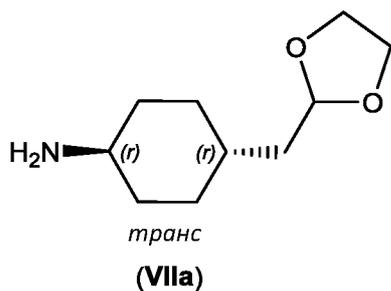
43. Способ по любому из пунктов с 38 по 40, отличающийся тем, что фермент из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующийся последовательностью SEQ ID NO: 2/ используют в качестве трансаминазы в периодическом режиме.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что трансаминазу из *Vibrio fluvialis* /VfS-TA, характеризующуюся последовательностью SEQ ID NO: 2/, используют в цельноклеточной форме, или в иммобилизованной цельноклеточной форме, или в растворимой бесклеточной форме, или в иммобилизованной бесклеточной форме.

45. Способ по любому из пунктов с 38 по 40, отличающийся тем, что цис-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ используют в режиме непрерывного потока.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что в нем используют *цис*-селективную мутантную (W60C) трансаминазу из *Chromobacterium violaceum* /CvS_{W60C}-TA/ с ковалентной иммобилизацией на пористой полимерной основе.

47. Способ по любому из пунктов с 38 по 46, отличающийся тем, что в нем, исходя из диастереомерной смеси 4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-аминов (формула VIIa + формула VIIIa), получают чистый *транс*-4-((1,3-диоксолан-2-ил)метил)циклогексан-1-амин (формула VIIa).



SEQ ID NO. 1 (CvS_{W60C}-TA)

HHHHHHMQKQRTTSQWRELDAAHHLHPFTDTASLNQAGARVMTRGE
GVYLDWSEGNKIIDGMAGLCCVNVGYGRKDFAEAARRQMEELPFYN
TFFKTTHPAVVELSSLLAEVTPAGFDRVFYTN SGSESVD TMIRMVR
RYWDVQ GKPEKKT LIGRWNGYHGSTIGGASLGGMKYMHEQGDLPI P
GMAHIEQPWWYKHGKDMTPDEFGVVAARWLEEKILEIGADKVAAFV
GEPIQGAGGVIVPPATYWPEIERICRKYDVLLVADEVICGFGRTGE
WFGHQHFGFQPDLF TAAKGLSSGYLP IGA V FVGKRVAEGLIAGGDF
NHGFTYSGHPVCAAVAHANVAALRDEGIVQRVKDDIGPYMQKRWRE
TFSRFEHVDDVRGVGMVQAFTLVKNKAKRELFPDFGEIGTLCRDIF
FRNNLIMRACGDHIVSAPPLVMTRAEVDEMLAVAERCLEEF EQTLK
ARGLA

FIG. 1

SEQ ID NO. 2 (*VfS-TA*)

MASRGS**HHHHHH**GANKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRTVVV
THGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLWNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERF
PGYHAFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRV FYTNSGSEANDTMV
KMLWFLHAAEGKPQKRKILTRWNAYHGVTAVSASMTGKPYNSVFGL
PLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTI
AGFFAEPVMGAGGVI PPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFG
RTGNTWGCVTYDFTPD AIISSKNLTAGFFPMGAVILGPELSKRLET
AIEAIEEFPHGFTASGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRR LAPR
FEERLKHIAERP NIGEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSE
RIANTCTDLGLICRPLGQSVVLCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDK
VFAEVA

FIG. 2

Парное выравнивание последовательностей >
 программа EMBOSS Needle

```

# Выровненных последовательностей: 2
# 1: CvS-TA
# 2: Vfs-TA
# Матрица: EBLOSUM62
# Штраф за гэп (пропуск в последовательности): 10.0
# Расширение штрафа: 0.5
# Длина: 469
# Идентичность:      174/469 (37.1%)
# Сходство:          255/469 (54.4%)
# Гэпы:              25/469 ( 5.3%)
# Оценка: 790.5
-----
CvS60c-TA  1 MQKQRTTSQWRELDAAHLLHPFTDTASLNQAGARVMTRGEGVYLWDSEGN      50
                |   : |: ||| ||:| | |:| ||| |: | |
Vfs-TA      1 --GANKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVVTHGEGPYIVDVNGR      48

CvS60c-TA  51 KIIDGMAGLCCVNVGYGRKDFAEAAARRQMEELPFYNTFFKTTTHPAVVELS    100
                : :| :|| : |: | :||: | | | |: || | ||
Vfs-TA      49 RYLDANSGLWNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHAFFGRMSDQTVMLS    98

CvS60c-TA 101 SLLAEVTPAGFDRVFYTNNGSESVDTMIRMVRRYWDVQGKPEKKTILGRW    150
                | ||:| | ||||| |||: |||::|: | |||:|: :: ||
Vfs-TA      99 EKLVEVSPFDSGRVFYTNNGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPKQRKILTRW    148

CvS60c-TA 151 NGYHGSTIGGASLGGMKYMHEQGDLP I PGMAHIEQPWWYKHKGD-MTPDE    199
                | ||| | ||: | | | ||:| | |: | ::::|: | :|
Vfs-TA      149 NAYHGVTAVSASMTGKPYNSVFG-LPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQ    197

CvS60c-TA 200 FGVVAARWLEEKILEIGADKVAAFVGEPIQGAGGVIVPPATYWPEIERIC    249
                |   || ||| | ||| :| | ||: ||||| | |: | |
Vfs-TA      198 FVARLARELEETIQREGADTIAGFFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPIL    247

CvS60c-TA 250 RKYDVLVVADEVICGFGRTGEWFGHQHFGFQPDLF TAAKGLSSGYLPIGA    299
                ||||: ::||| ||||| | | : | || :| |::|: |:||
Vfs-TA      248 RKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTAGFFPMGA    297

CvS60c-TA 300 VFVG----KRVAEGLIAGGDFNHGFTYSGHPVCAAVAHANVAALRDEGIV    345
                | :| ||: : | :| ||| |||| |:| : : :||:
Vfs-TA      298 VILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCALKAIDVVMNEGLA    347

CvS60c-TA 346 QRVKDDIGPYMQKRWRETFSRFEHVDDVRGVMVQAFTLVKNKAKRELFP    395
                : |: : | :|| : | :| : ||:| : | ||:| : |
Vfs-TA      348 ENVR-RLAPRFEERLKHIAER-PNIGEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFD    395

CvS60c-TA 396 D----FGEIGTLCRDIFFRN NLMRACGDHIVSAPPLVMTRAEVDEMLAV    441
                | | |: || | | :| || :| |::| |::||
Vfs-TA      396 GNLSVSERIANTCTDL----GLICRPLGQSVVLCPPFILTEAQMDEMFDK    441

CvS60c-TA 442 AERCLEE-FEQLKARGLA      459
                |: |:: | :
Vfs-TA      442 LEKALDKVFAEVA-----      454
  
```

FIG. 3

SEQ ID NO. 3 (ATA-217: вариант *VfS*-ТА с 17 мутациями, отмеченными жирным шрифтом, подчеркнуты)

MNKPQSWETTRAETYSLYGFTDMPSLHQRTVVVTHGEGPYIVDVHG
RRYLDANSGALNMVAGFDHKGLIDAAKTQYERFPGYHAFSGRMSDQ
TVMLSEKLVEVSPFDSGRV FYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKP
QKRKILTRWNAYHGATAVSASMTGFPYNSVFGLPLPGFLHLTCPHY
WRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQKEGADTIAGFFAEPVMGAGG
VIIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDF
TPDAIISSKSLTAGFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFT
TGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRLLAPRFEERLKHIAERP
NIGEYRGIGFMWALEVVKDKASKAPFGNLSVSERIANTCTDLGLIC
RPLGQSVVLCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA

FIG. 4