



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 705**

51 Int. Cl.:
C07D 209/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05823911 .2**

96 Fecha de presentación : **22.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1833789**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de ácido indolin-2-carboxílico enriquecido enantioméricamente.**

30 Prioridad: **28.12.2004 EP 04078542**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es: **De Vries, Andreas, Hendrikus, Maria;**
De Vries, Johannes, Gerardus;
Van Assema, Friso, Bernard, Jan;
De Lange, Ben;
Mink, Daniel;
Hyett, David, John y
Maas, Peter, Johannes, Dominicus

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

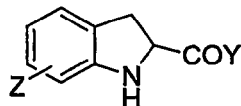
ES 2 366 705 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de ácido indolin-2-carboxílico enriquecido enantioméricamente

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido indolin-2-carboxílico opcionalmente sustituido enriquecido enantioméricamente según la fórmula (1)



(1)

5 o sus sales, en la que Y es un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono sustituido o no sustituido, un grupo ariloxi sustituido o no sustituido, o un resto amínico, y en la que Z representa uno o más sustituyentes en un grupo aromático que se escogen de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alifático cíclico o acíclico con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico alifático con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)arilo opcionalmente sustituido, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un átomo de halógeno, un grupo amina, un grupo nitro, un ácido carboxílico, un éster carboxílico, una amida carboxílica, un grupo nitrilo o grupo trifluorometilo.

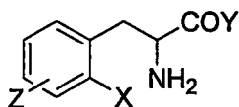
15 Los ácidos indolin-2-carboxílicos enriquecidos enantioméricamente según la fórmula (1) son intermediarios importantes para productos farmacéuticos, en particular en la preparación de inhibidores de la enzima convertora de angiotensina I (ACE), que se usan para el tratamiento de tensión arterial alta (hipertensión). Por ejemplo, el ácido (S)-indolin-2-carboxílico ópticamente activo se puede usar en la preparación de ácido [2S-[1[R*(R*),2 α ,3 α ,7 α]]-1-[2-[[1-(etoxicarbonil)butil]amino]-1-oxopropil]octahidro-1H-indol-2-carboxílico, también conocido con el nombre comercial Perindopril, que es útil como un ingrediente activo antihipertensivo (inhibidor de ACE) o cardiotónico. Otras aplicaciones útiles son, por ejemplo, Pentopril y Indolapril.

20 El documento EP 0937714 A1 describe un procedimiento para la preparación de ácido indolin-2-carboxílico ópticamente activo poniendo en contacto una mezcla de los enantiómeros del ácido N-acil-indolin-2-carboxílico con un agente de resolución ópticamente activo, liberando el ácido N-acil-indolin-2-carboxílico ópticamente activo de la sal diastereómera resultante, y, después, desacilando el ácido N-acil-indolin-2-carboxílico ópticamente activo con formación de ácido indolin-2-carboxílico ópticamente activo.

25 Una desventaja del procedimiento es que dicho procedimiento es más bien complicado, y que se necesita una etapa adicional para separar los dos enantiómeros en la mezcla racémica de ácido N-acil-indolin-2-carboxílico. Finalmente, el ácido indolin-2-carboxílico ópticamente activo deseado se puede obtener con un rendimiento de 50% máximo. En conjunto, el procedimiento conocido es más bien caro.

30 Es un objeto de la invención proporcionar un procedimiento barato, relativamente simple y comercialmente atractivo para la preparación de ácido indolin-2-carboxílico enriquecido enantioméricamente según la fórmula (1) con un rendimiento aceptable.

Esto se ha logrado según el procedimiento de la presente invención, sometiendo a cierre de anillo a un compuesto fenilalanínico sustituido con X en posición orto, enriquecido enantioméricamente, según la fórmula (2),



(2)

35 o sus sales, en la que Y y Z son como se define anteriormente, y X es un grupo saliente, preferiblemente a una temperatura por debajo de alrededor de 140°C con formación de ácido indolin-2-carboxílico opcionalmente sustituido quiral, enriquecido enantioméricamente, según la fórmula (1).

40 Sorprendentemente, se ha encontrado que con el procedimiento de la presente invención se puede obtener ácido indolin-2-carboxílico enriquecido enantioméricamente de fórmula (1) con un rendimiento relativamente elevado y en exceso enantiomérico (e.e.). Además, el procedimiento de la invención es atractivo para el aumento de escala para aplicaciones industriales. Usando el método de la invención, se reduce enormemente el número de operaciones unitarias, necesarias para obtener los derivados de ácido indolin-2-carboxílico a partir de materiales de partida fácilmente disponibles, en comparación con la técnica anterior. El uso del método de la invención es mucho más económico en el uso de materiales de partida, puesto que, en los procedimientos conocidos en la técnica anterior, la

mitad del producto final se desechaba o era necesario mejorarlo mediante un procedimiento de racemización caro. El procedimiento de la invención tiene la ventaja adicional de que no se produce, o se produce sólo en grado limitado, la racemización del sustrato (compuesto de partida (2)) así como del producto de reacción (1).

5 El procedimiento de ciclación de la invención se puede definir como una reacción de aminación arílica, que generalmente se conoce en la técnica como una reacción de acoplamiento de Ullmann. El procedimiento se refiere a una reacción de aminación arílica intramolecular. La expresión "enriquecido enantioméricamente" es equivalente a la expresión "ópticamente activo", y significa que uno de los enantiómeros de un compuesto está presente en exceso en comparación con el otro enantiómero. Este exceso se denominará aquí en lo sucesivo como "exceso enantiomérico" o e.e. (según se determina, por ejemplo, mediante análisis de GLC o HPLC quiral). El exceso enantiomérico, e.e., es igual a la diferencia entre las cantidades de enantiómeros divididas entre la suma de las cantidades de los enantiómeros, cociente el cual se puede expresar como un porcentaje después de multiplicarlo por 100. El término "indolina" es igual a "2,3-dihidro-1H-indol"; las expresiones "fenilalanina sustituida con X en posición orto o 2" son iguales a "ácido 2-amino-3-(fenilo sustituido con X en posición 2)-propiónico"; la expresión "ácido cinámico sustituido con X en posición orto o 2" es igual a "ácido 3-(sustituido con X en posición 2) acrílico"; y estos términos se usan de forma intercambiable a lo largo de esta solicitud.

En la fórmula (2), X es un grupo saliente, y se puede seleccionar del grupo que consiste en un átomo de halógeno escogido de fluoruro, cloruro, bromuro, o yoduro, un grupo mesilato, un nosilato, un grupo tosilato, un grupo triflato, ácido borónico, o similar. X se escoge preferiblemente de cloruro, bromuro, yoduro, o un grupo mesilato; más preferiblemente, X es cloruro o bromuro; incluso más preferido – debido a su bajo coste – es cloruro.

20 Los ejemplos adecuados de Z e Y en los compuestos enriquecidos enantioméricamente según las fórmulas (1) y (2) son, por ejemplo, compuestos en los que Z es hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, trifluorometilo, fluoruro, hidroxilo, metoxi, etoxi, benciloxi, ácido carboxílico, éster metílico de ácido carboxílico, nitrilo, o sus combinaciones, e Y es hidroxilo, metoxi, etoxi, benciloxi, amina, metilamina, dimetilamina, o bencilamina. Las sustitución opcional en caso de que Z sea un grupo alifático cíclico o acíclico, un grupo heterocíclico alifático, un grupo (hetero)arilo o un grupo alcoxi, y en caso de que Y sea un grupo alcoxi o ariloxi, se puede escoger de un trihalogenuro, por ejemplo trifluorometilo, triclorometilo; un átomo de halógeno, por ejemplo fluoruro, cloruro o yoduro; un grupo amina, por ejemplo metilamina, dimetilamina, bencilamina, etilamina, propilamina, fenilamina, 4-fluorofenilamina; un grupo alcoxi o ariloxi, por ejemplo, metoxi, etoxi, isopropoxi, benciloxi, fenoxi, 4-fluorofenoxi, 3-fluorofenoxi, 2-fluorofenoxi; un tioéter, por ejemplo metiltioéter, etiltioéter, benciltioéter; un trihaloalquiléter, por ejemplo trifluorometiléter; un arilo o heteroarilo, por ejemplo fenilo, 4-fluorofenilo, 3-fluorofenilo, 2-fluorofenilo, 2-trifluorometilfenilo, 3-trifluorometilfenilo, 4-trifluorometilfenilo, tiofeno, furano, pirazol, pirrol, imidazol, o similar. Se prefieren compuestos en los que Z es hidrógeno, trifluorometilo, fluoruro, hidroxilo, metoxi o nitrilo, e Y es hidroxilo. Preferiblemente, Z en la fórmula (1) es hidrógeno e Y es hidroxilo; más preferido, con el procedimiento de la presente invención se prepara ácido (S)-indolin-2-carboxílico. Los ejemplos adecuados de sales de compuestos según fórmulas (1) y (2) son, por ejemplo, la sal de HCl, la sal de HBr, la sal de ácido acético, la sal de ácido metanosulfónico, la sal de ácido bencenosulfónico, la sal de ácido p-toluenosulfónico, la sal de ácido maleico, la sal de ácido tartárico, la sal de ácido cítrico, o la sal de ácido glucónico de los mismos.

40 Los ejemplos adecuados de compuestos según la fórmula (2) son, por ejemplo, 2-bromo-fenilalanina, 2-clorofenilalanina, 2-yodo-fenilalanina, éster metílico de la 2-bromo-fenilalanina, éster metílico de la 2-clorofenilalanina, éster metílico de la 2-yodo-fenilalanina, éster etílico de la 2-bromofenilalanina, éster etílico de la 2-clorofenilalanina, éster etílico de la 2-yodo-fenilalanina, éster bencilico de la 2-bromofenilalanina, éster bencilico de la 2-clorofenilalanina, éster bencilico de la 2-yodo-fenilalanina, amida de la 2-bromofenilalanina, amida de la 2-clorofenilalanina, amida de la 2-yodo-fenilalanina, o similar. Se prefieren 2-bromofenilalanina, 2-clorofenilalanina, éster bencilico de la 2-bromofenilalanina y éster bencilico de la 2-clorofenilalanina. Son más preferidos la 2-bromofenilalanina y la 2-clorofenilalanina. Incluso se prefieren más los enantiómeros (S) de los ejemplos respectivos de los compuestos (2).

En el procedimiento de la invención, la pureza óptica del compuesto según la fórmula 2 (sustrato) es preferiblemente al menos alrededor de 50%, más preferido al menos alrededor de 75%, incluso más preferido al menos alrededor de 90%, particularmente preferido al menos alrededor de 95%, y lo más preferido al menos alrededor de 98%.

50 Preferiblemente, en las condiciones del procedimiento de ciclación de la presente invención, el compuesto según la fórmula 2 se puede convertir en un compuesto según la fórmula 1 con una pérdida de integridad estereoquímica menor que alrededor de 40%, más preferido menor que alrededor de 20%, incluso más preferido menor que alrededor de 10%, particularmente preferido menor que alrededor de 5%, y lo más preferido menor que alrededor de 2%. Preferiblemente, el compuesto (2) se convierte en el compuesto (1) sin sustancialmente pérdida de estereoquímica. La definición "pérdida de integridad estereoquímica" es igual a la diferencia entre el e.e. del compuesto (2) y el e.e. del compuesto (1), dividida entre el e.e. del compuesto (2), cociente el cual se expresa como un porcentaje después de multiplicarlo por 100.

Preferiblemente, durante el procedimiento de la invención, se retiene la estereoquímica del compuesto (2) hasta tal

grado que el ácido indolin-2-carboxílico de fórmula (1) se puede obtener en un exceso enantiomérico (e.e.) de al menos alrededor de 30%, más preferido al menos alrededor de 50%, incluso más preferido al menos alrededor de 80%, particularmente preferido al menos alrededor de 95%, y lo más preferido al menos alrededor de 98%.

5 El compuesto (1) puede estar enriquecido en el enantiómero del ácido (S)-indolin-2-carboxílico opcionalmente sustituido o en el enantiómero del ácido (R)-indolin-2-carboxílico opcionalmente sustituido, preferiblemente en el enantiómero del ácido (S)-indolin-2-carboxílico opcionalmente sustituido. Lo más preferido, el ácido (S)-indolin-2-carboxílico se prepara con el procedimiento de la presente invención.

10 El procedimiento de la invención se aplica a una temperatura por debajo de alrededor de 140°C, preferiblemente entre alrededor de 15 y alrededor de 130°C, más preferido entre alrededor de 30 y alrededor de 120°C, particularmente preferido entre alrededor de 40 y alrededor de 110°C, lo más preferido entre 60 y 100°C.

15 La adición de un catalizador metálico no es un prerrequisito para lograr rendimientos y e.e. aceptables con el procedimiento de la presente invención. Como alternativa, el procedimiento de la invención se puede aplicar eficientemente en presencia de un catalizador metálico relativamente barato, o en presencia de una cantidad relativamente pequeña de un catalizador en cierto modo más caro. En conjunto, el procedimiento de la presente invención se puede aplicar eficientemente en condiciones de reacción que pueden producir un procedimiento comercialmente atractivo a mayor escala.

Según una realización de la presente invención, el procedimiento se puede llevar a cabo sustancialmente en ausencia de un catalizador metálico. Esto tiene una ventaja particular sobre los costes del procedimiento, y evita la necesidad de eliminar el catalizador después del uso.

20 Según una realización adicional de la presente invención, el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador metálico, preferiblemente un átomo o ion de metal de transición. El átomo o ion metálico puede actuar como catalizador para la reacción de ciclación de la invención, y se puede usar como tal o en combinación con un ligando o grupo coordinante. Preferiblemente, el metal se usa como tal, en ausencia de un ligando. Esto se prefiere particularmente puesto que evita los costes de un ligando – a menudo relativamente caro -.
25 El metal se puede seleccionar de los grupos 8 a 11 de la Tabla Periódica de los Elementos, y se puede escoger en particular de cobre, oro, hierro, rutenio, cobalto, rodio, iridio, níquel, paladio o platino. Preferiblemente, se usan catalizadores a base de metales de los grupos 10 y 11, más preferiblemente metales escogidos de cobre, paladio, níquel, hierro o rutenio, o sus mezclas, incluso más preferido se usan cobre, paladio o níquel. Los catalizadores a base de cobre son particularmente preferidos puesto que son bastante baratos, y bajas cantidades pueden ser
30 suficiente para producir productos con buenos rendimientos y e.e.

Por ejemplo, cuando X en el compuesto de fórmula 2 es bromuro, el procedimiento de la invención se aplica preferiblemente en ausencia de cobre o de cualquier otro metal. Cuando X es, por ejemplo, cloruro, el procedimiento de la invención se aplica preferiblemente en presencia de un metal o una combinación de metales, seleccionados de la lista dada anteriormente, más preferiblemente en presencia de cantidades relativamente pequeñas.

35 La cantidad de catalizador metálico usada depende de la actividad del catalizador para la reacción de ciclación específica y de los costes del catalizador. Una persona experta es capaz de escoger el catalizador más económicamente factible con respecto a la cantidad, tipo de metal, ligandos, y similares, para la conversión dada.

40 Preferiblemente, la relación molar entre el átomo o ion metálico y el compuesto de fórmula (2) está entre 0,00001 a 50% en moles, más preferido entre 0,01 y 30% en moles, incluso más preferido entre 0,05-15% en moles, particularmente preferido entre 0,1 y 7% en moles, incluso más preferido entre 0,2 y 5% en moles, y lo más preferido entre 0,5 y 3% en moles. Cuando se usan los metales más caros, tales como, por ejemplo, paladio, oro, rutenio o rodio, se prefiere particularmente usar cantidades relativamente pequeñas, preferiblemente entre alrededor de 0,00001 y 7% en moles, más preferido entre 0,01 y 5% en moles, incluso más preferido entre 0,05-3% en moles, particularmente preferido entre 0,1 y 1% en moles, y lo más preferido entre 0,2 y 0,5% en moles.

45 El uso de cantidades nulas o pequeñas cantidades de metal en el procedimiento de la invención tiene la ventaja de que no se requiere o es más fácil la eliminación del metal.

Los ejemplos adecuados de metales que se pueden usar en el procedimiento de la invención son cualesquiera metales de los grupos 8 a 11 de la Tabla Periódica según se indica anteriormente, que son conocidos por una persona experta en la técnica de reacciones de aminación arílica.

50 Los ejemplos de átomos o iones de cobre que se pueden usar en el procedimiento de la presente invención son cobre metálico o compuestos orgánicos o inorgánicos de cobre(I) o cobre(II). Los ejemplos adecuados de catalizadores de cobre en el procedimiento de la invención son cloruro de cobre(I), cloruro de cobre(II), bromuro de cobre(I), bromuro de cobre(II), yoduro de cobre(I), yoduro de cobre(II), carbonato básico de cobre(II), nitrato de cobre(I), nitrato de cobre(II), sulfato de cobre(II), sulfuro de cobre(I), sulfuro de cobre(II), acetato de cobre(I), acetato
55 de cobre(II), óxido de cobre(I), óxido de cobre(II), trifluoroacetato de cobre(I), trifluoroacetato de cobre(II), benzoato

de cobre(I), benzoato de cobre(II), trifluorometilsulfonato de cobre(II), y similares. Se prefieren cloruro de cobre(I), cloruro de cobre(II), bromuro de cobre(I) y bromuro de cobre(II). Estos catalizadores están fácilmente disponibles y son relativamente baratos. Los ejemplos adecuados de átomos o iones de oro se pueden escoger de, por ejemplo, oro metálico, cloruro de oro (I), cloruro de oro(III), óxido de oro(III), y similares. Los ejemplos adecuados de metales de hierro son cloruro de hierro(II), cloruro de hierro(III), bromuro de hierro(II), bromuro de hierro(III), óxido de hierro(II), óxido de hierro(III), y similares. Los ejemplos adecuados de metales de rutenio son bromuro de rutenio(III), cloruro de rutenio(III), y similares. Los ejemplos de metales adecuados de cobalto son cobalto Raney, cloruro de cobalto(II), bromuro de cobalto(II), óxido de cobalto(II), o similares. Los ejemplos de metales adecuados de rodio son, por ejemplo, dímero de acetato de rodio(II), y cloruro de rodio(III). Los ejemplos de metales adecuados de iridio son, por ejemplo, bromuro de iridio(III) y cloruro de iridio(III). Los ejemplos de metales adecuados de níquel son, por ejemplo, níquel en polvo, bromuro de níquel(II), cloruro de níquel(II), o níquel Raney. Los ejemplos de metales adecuados de paladio son cloruro de paladio(II), acetato de paladio(II), o similares. Los ejemplos de metales adecuados de platino son bromuro de platino(II), cloruro de platino(II), cloruro de platino(IV) y óxido de platino(IV).

Cuando el procedimiento de la invención se lleva a cabo en presencia de un metal, puede estar presente – aunque no es necesario – un ligante/grupo coordinante. Con la expresión “grupo coordinante” se quiere decir que el grupo es capaz de unirse con un átomo o ion de metal de transición, preferiblemente donando densidad electrónica a un átomo o ion de metal de transición. El ligando se puede escoger de un ligando monodentado (es decir, que comprende un átomo o grupo coordinante que se une en el metal), bidentado (es decir, que comprende dos átomos o grupos coordinantes que se unen en el metal, enlazándose dichos dos grupos coordinantes juntos formando un ligando bidentado), tridentado, tetra- o polidentado, o una combinación de dos o más de los mismos. Los átomos coordinantes se pueden escoger de los grupos que consisten en nitrógeno, oxígeno, fósforo, y azufre, preferiblemente escogidos de nitrógeno, oxígeno o azufre, puesto que los ligandos que contienen fósforo habitualmente son relativamente sensibles a la oxidación, y/o la eliminación de los mismos de la mezcla de reacción puede ser más difícil. Los ejemplos de ligandos adecuados son conocidos para la persona experta en la técnica, y se describen por ejemplo en S. Ley, A. W. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 5400-5449. El ligando también puede servir como un disolvente en el procedimiento de la invención.

La relación entre el ligando y el átomo metálico puede ser de forma adecuada 0,1 o superior, preferiblemente entre 1 y 10, y más preferido entre 1 y 3.

El átomo o ion metálico y el ligando – si está presente – del catalizador se pueden añadir a la mezcla de reacción de forma separada o simultáneamente, o se pueden añadir en forma de un complejo catalítico preformado. Un ejemplo adecuado de un complejo catalítico preformado es Cu(II)(2,4-pentandiona)₂.

El procedimiento de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una base. La base se puede escoger de aminas, bases y sales básicas de metales alcalinos y metales alcalino-térreos, y bases heterogéneas tales como, por ejemplo, intercambiadores iónicos básicos, zeolitas básicas, o similares. Las aminas se pueden escoger de aminas primarias, tales como, por ejemplo, butilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, bencilamina, etilendiamina, monoetanolamina, o similares; aminas secundarias, tales como, por ejemplo, dietilamina, dibutilamina, dietanolamina, morfolina, piperidina, piridina y similares; o aminas terciarias, tales como, por ejemplo, diisopropiletilamina, trietilamina, tripropilamina, tributilamina, 4-N,N-dimetilaminopiridina, o similares. Los ejemplos adecuados de intercambiadores iónicos básicos pueden ser Amberlite IRA 67, Dowex 1, Dowex 2, y similares. Los ejemplos adecuados de zeolitas básicas pueden ser, por ejemplo, CsNa-Y y similares, según se describe en *Chem. Rev.* 1995, Vol. 95, páginas 537-558. La base se escoge preferiblemente de bases y sales básicas de metales alcalinos y metales alcalino-térreos, debido a un tratamiento generalmente fácil. Más preferiblemente, la base se escoge del grupo de carbonatos de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos, hidrogenocarbonatos de metales alcalinos y metales alcalino-térreos, acetatos de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos, hidróxidos de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos, alcóxidos de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos, y fosfatos de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos. Los metales de metales alcalinos y metales alcalino-térreos preferidos son Na, K, Ca y Mg. Más preferido, la base se escoge de K₂CO₃, NaOAc, KOAc, Na₂CO₃, CaCO₃, K₃PO₄, NaHCO₃, Li₂CO₃, y Cs₂CO₃. Las bases especialmente preferidas son K₂CO₃, Na₂CO₃, K₃PO₄, NaOAc y KOAc, puesto que estas bases están fácilmente disponibles y son baratas. Las bases más preferidas son K₂CO₃, Na₂CO₃ y K₃PO₄.

El procedimiento de la invención se puede aplicar en un disolvente, tal como por ejemplo un disolvente orgánico, agua, líquidos iónicos, como se describe por ejemplo en T. Welton, *Chem. Rev.*, 99, 2071-2083 (1999), o similares. Los disolventes adecuados que se pueden usar en el procedimiento según la invención son disolventes que no reaccionan en las condiciones de reacción, por ejemplo disolventes polares, tales como, por ejemplo, éteres, amidas y similares, o hidrocarburos, tales como tolueno. También se puede usar una mezcla de disolventes. Los disolventes particularmente adecuados son disolventes polares apróticos, por ejemplo N-metilpirrolidinona (NMP), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, glicinas, por ejemplo éter dimetilico del etilenglicol, y similares. La N-metilpirrolidinona (NMP) es un disolvente particularmente adecuado en el procedimiento de la presente invención. Además, NMP es un disolvente medioambientalmente inocuo. En casos

específicos, los agentes reaccionantes, las bases, los ligandos y/o los productos pueden servir como un disolvente.

Según una realización preferida de la presente invención, el procedimiento se lleva a cabo en agua. Las ventajas del uso de agua es que el agua es un disolvente medioambientalmente muy inocuo, es barato y es muy abundante. Además, un compuesto según la fórmula (1) se puede obtener en general de forma relativamente fácil en agua o en un entorno acuoso, por ejemplo ajustando el pH y subsiguientemente, por ejemplo, filtrando dicho compuesto (1), o mediante extracción de dicho compuesto (1) en una fase orgánica. El uso de agua como disolvente es particularmente ventajoso si el compuesto de partida de fórmula (2) se obtiene vía un proceso enzimático en agua, como se describe adicionalmente más abajo en "Procedimiento de preparación (A)", puesto que en ese caso no se necesitan disolventes orgánicos para la parte más importante de la fabricación. En el caso de que la reacción se lleve a cabo en disolución acuosa, la sal del material de partida de fórmula (2) puede servir opcionalmente por sí misma como una base, o se puede usar en combinación con una base añadida externamente como se enumera anteriormente.

El procedimiento según la invención se puede aplicar en presencia de uno o más aditivos, como tensioactivos, tales como catalizadores de transferencia de fase, tales como, por ejemplo, sales de amonio cuaternario, en particular sales de cloruro o bromuro de tetrabutilamonio, bromuro de trietilbencilamonio, o cloruro de tetraetilamonio, y similares. Otros posibles aditivos son sales tales como, por ejemplo, cloruro de litio. El procedimiento según la invención se puede aplicar usando estímulos externos, por ejemplo calentamiento por microondas, ultrasonido o luz.

El procedimiento de la presente invención se lleva a cabo generalmente a presión atmosférica, o en una vasija cerrada. El procedimiento se lleva a cabo preferiblemente en una atmósfera de nitrógeno o de argón.

El orden en el que los reactivos se añaden no es crítico. Un orden adecuado puede ser aquel en el que se cargue el compuesto (2), la base opcional, opcionalmente el catalizador/metál, y opcionalmente el disolvente y/o agua. Después, la mezcla de reacción se calienta hasta la temperatura deseada. Otro orden adecuado puede ser aquel en el que se cargue el disolvente opcional y en el que se le añadan el compuesto (2) y los componentes opcionales. Otro orden adecuado puede ser aquel en el que se cargue una mezcla del disolvente y el compuesto (2) y se le añadan los otros reactivos opcionales.

En caso de que se use un catalizador, dicho catalizador se puede separar de la mezcla de reacción, por ejemplo, mediante extracción, filtración, decantación o centrifugación, o mediante adición de un agente complejante que puede provocar la precipitación o disolución del metal. Los ejemplos adecuados de agentes complejantes son, por ejemplo, compuestos que contienen azufre o nitrógeno, tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), o sus formas inmovilizadas, y similares, amoníaco, quinolinas, bisquinolinas, y similares, sulfuro de sodio(II), ácido tiocianúrico y similares, intercambiadores iónicos ácidos y similares. Otras formas adecuadas para separar el catalizador de la mezcla de reacción pueden ser mediante bioabsorción sobre una enzima, mediante complejación con una zeolita, mediante adsorción sobre un soporte sólido, tal como celita o sílice, o mediante cualquier otro método conocido por la persona experta en la técnica. En caso de que se use cobre metálico, preferiblemente en cantidades relativamente pequeñas tales como entre alrededor de 0,0001 y 7% en moles con relación a la cantidad de compuesto (2), el cobre metálico se elimina preferiblemente mediante extracción, filtración, filtración sobre un soporte sólido, o complejándolo con, por ejemplo, EDTA o ácido tiocianúrico.

El producto (1) obtenido con el procedimiento de la presente invención se puede purificar adicionalmente mediante métodos conocidos normalmente en la técnica, por ejemplo mediante extracción, cristalización, destilación o cromatografía.

Con el procedimiento de la presente invención, el ácido indolin-2-carboxílico enriquecido enantioméricamente de fórmula (1) se puede obtener con una conversión y rendimiento relativamente elevados.

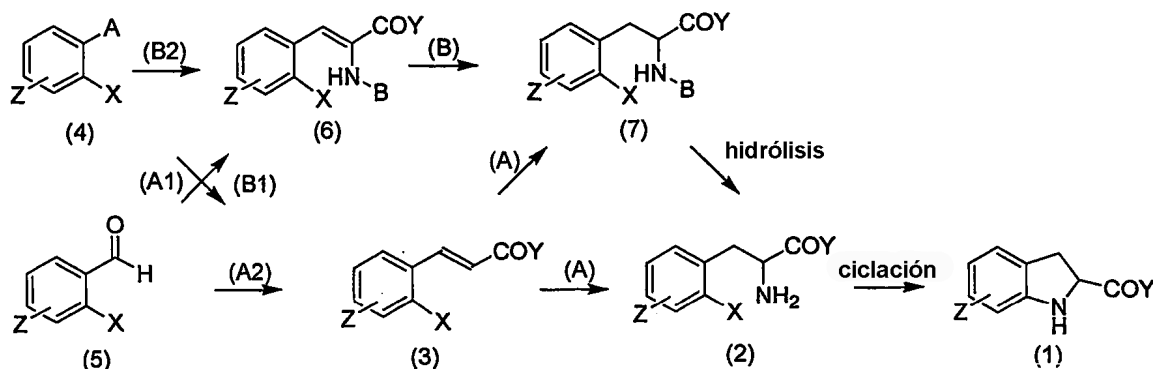
El rendimiento obtenido con el procedimiento de la presente invención es preferiblemente al menos 30%, más preferido al menos 40%, incluso más preferido al menos 50%, particularmente preferido al menos 60%, y lo más preferido al menos 80%.

El compuesto (1), en particular el ácido (S)-indolin-2-carboxílico ópticamente activo, se puede usar como un intermedio en productos farmacéuticos, en particular en la preparación de Perindopril, Pentopril o Indolapril.

Preparación del compuesto (2)

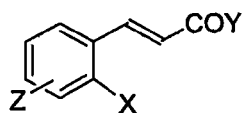
El procedimiento de la presente invención implica un compuesto fenilalanínico sustituido en posición orto enriquecido enantioméricamente según la fórmula (2) como se define anteriormente. Este compuesto (2) enriquecido enantioméricamente se puede preparar según varios procedimientos diferentes, preferiblemente según los procedimientos (A) a (G) y otros procedimientos adecuados descritos en la presente solicitud, preferiblemente (A) a (D), más preferido (A) a (C), y lo más preferido el procedimiento (A) o (B).

La siguiente figura visualiza la conversión específica según los procedimientos (A) y (B) como se describe más abajo:



Procedimiento de preparación (A) para formar compuesto (2) enriquecido enantioméricamente [etapa de PAL]

- 5 En una realización de la invención, el compuesto (2) enriquecido enantioméricamente se prepara a partir del derivado de ácido cinámico sustituido con X en posición orto, de fórmula (3)



(3)

- 10 o una sal del mismo, en la que X, Y y Z son como se define anteriormente, haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (3) con un dador de grupo amino en presencia de una enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) estereoselectiva. Esta realización se denominará aquí en lo sucesivo como etapa de PAL o Procedimiento (A).

Preferiblemente, en esta realización de la invención, el X en el ácido cinámico sustituido con X en la posición 2 de fórmula (3) representa bromuro o cloruro, preferiblemente cloruro puesto que se obtienen resultados particularmente buenos en el caso de que X sea cloruro.

- 15 Con "estereoselectividad" de PAL se quiere decir que PAL cataliza preferentemente la formación de uno de los enantiómeros del compuesto (2). La estereoselectividad de una enzima se puede expresar en términos de la relación E, la relación de las constantes de especificidad V_{\max}/K_m de los dos enantiómeros como se describe en C-S. Chen, Y Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih., *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 7294-7299. En el marco de la invención, la relación E de una PAL se determina usando los valores de V_{\max} y K_m según se determinan en la desaminación no oxidativa del compuesto fenilalanínico sustituido con X en posición orto (= compuesto (2)) usando PAL.

- 20 Preferiblemente, PAL forma productos con un e.e. de >80%; más preferiblemente, PAL forma productos con un e.e. de >90%; incluso más preferiblemente, PAL forma productos con un e.e. de >95%; lo más preferible, PAL forma productos con un e.e. de >99%. Preferiblemente, PAL cataliza estereoselectivamente la formación del enantiómero (S) del compuesto (2); más preferiblemente en esta realización de la invención, se forma el compuesto (S)-fenilalanínico (2) sustituido con cloro en posición orto.

- 25 En el marco de la invención, PAL se define como una enzima que tiene la capacidad para catalizar la aminación no reductora reversible del derivado de ácido cinámico sustituido con X en posición orto [compuesto (3)] hasta el compuesto fenilalanínico sustituido con X en posición orto (= compuesto (2)), y se puede escoger de fenilalanina amonio liasas de la clase 4.3.1 de EC, en particular de la clase 4.3.1.5 de EC. Los ejemplos de enzimas PAL adecuadas son conocidos para la persona experta en la técnica, e incluyen, por ejemplo, fenilalanina o tirosina amonio liasas bacterianas, por ejemplo de *Streptomyces maritimus* o *Rhodobacter capsulatus*, fenilalanina amonio liasas de levaduras, por ejemplo PAL procedente de *Rhodospiridium toruloides* (en la bibliografía denominada algunas veces también como *Rhodotorula glutinis* o *Rhodotorula graminis*) y fenilalanina amonio liasas vegetales, por ejemplo PAL de *Petroselinum crispum* o *Zea mays*. Preferiblemente, PAL se escoge del grupo de fenilalanina amonio liasas de levaduras, más preferiblemente del grupo de las PAL de *Rhodospiridium* sp. La PAL incluso más preferida es PAL de *Rhodospiridium toruloides*, en particular PAL de *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. Más preferido, la PAL es PAL de *Rhodospiridium toruloides*, de la cual la secuencia proteica es la secuencia CAA31209 de la base de datos de proteínas de NCBI.
- 30
- 35

Esta realización de la invención no está de ningún modo limitada por la forma en la que se usa la PAL. Por ejemplo, la PAL puede estar presente en la etapa de PAL en una forma escogida de una disolución de enzima bruta, una disolución de enzima purificada, células (permeabilizadas y/o inmovilizadas) que de forma natural o a través de una modificación genética poseen actividad de PAL, en un lisado de células con tal actividad, en forma inmovilizada, en forma químicamente modificada, u otras formas conocidas por una persona experta en la técnica, o en una combinación de dos o más de estas formas.

Será claro para la persona experta en la técnica que también se puede hacer uso de mutantes de enzimas PAL de origen natural (tipo salvaje). Por ejemplo, es posible obtener mutantes con actividad de PAL, es decir, mutantes que muestran una actividad superior a PAL de tipo salvaje sobre al menos un sustrato, mutantes de la expresión de PAL, es decir, mutantes que se expresan mejor que PAL de tipo salvaje, y similares. Los mutantes con actividad de PAL de enzimas de tipo salvaje se pueden obtener, por ejemplo, modificando el ADN que codifica las enzimas de tipo salvaje usando técnicas de mutagénesis conocidas por la persona experta en la técnica (mutagénesis al azar, mutagénesis dirigida al sitio, evolución dirigida, barajado génico, etc.), de manera que el ADN codifique una enzima que difiere en al menos un aminoácido de la enzima de tipo salvaje, y expresando en una célula (hospedante) adecuada el ADN así modificado. Como alternativa, los mutantes de la expresión de PAL se pueden preparar modificando el ADN que codifica enzimas PAL de tipo salvaje usando técnicas de mutagénesis conocidas por la persona experta en la técnica, de manera que, si el ADN se expresa en una célula (hospedante), el nivel de expresión de PAL es mayor para el ADN mutado que para el ADN no mutado. La persona experta sabe cómo seleccionar estos mutantes de la expresión de PAL, por ejemplo midiendo la actividad relativa para al menos tres sustratos diferentes y comparando la relación de las actividades con la enzima de tipo salvaje. Los mutantes de la expresión tienen una actividad mayor para todos los sustratos diferentes, mientras que la relación de las actividades entre los sustratos es igual a la de la enzima de tipo salvaje. Los mutantes de la enzima PAL pueden tener propiedades mejoradas con respecto a la (estereo)selectividad y/o actividad y/o estabilidad y/o resistencia a disolventes y/o perfil de pH y/o perfil de temperaturas, y/o inhibición de la expresión y/o del producto y/o del sustrato, y dichos mutantes de PAL se pueden seleccionar específicamente basándose en la presencia de cualesquiera de estas propiedades mejoradas, solas o en combinación de dos o más de ellas.

Los dadores de grupos amino adecuados incluyen, por ejemplo, NH_3 o NH_4OH o B-NH_2 , en el que B es un grupo —COR¹, en el que R¹ se puede escoger de un grupo alifático cíclico o acíclico con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico alifático con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)arilo opcionalmente sustituido, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo sulfonilo opcionalmente sustituido, o similar. Si el dador del grupo amino es B-NH_2 , el compuesto (7) según se obtiene se someterá a una etapa de hidrólisis adicional, mediante la cual se forma el compuesto (2) (como se describe para el procedimiento (B) adicionalmente más abajo). Se prefieren NH_3 y NH_4OH . Por supuesto, también es posible usar una combinación de diversos dadores de grupos amino.

Puede ser ventajoso añadir un agente reductor a la etapa de PAL, para reducir los efectos negativos del oxígeno sobre la vida de PAL. Los ejemplos de tales agentes reductores incluyen sulfuro de hidrógeno, ácido tioglicólico, ácido tiosulfúrico, ácido nitroso, ácido sulfuroso, sales de amonio y metálicas de los anteriores, ditiotreitól, etilmercaptano, etilenmercaptano, metilmercaptano, 2-mercaptoetanol, hidrógeno, óxido nitroso, compuesto de hierro(II), compuestos de manganeso(II), azufre y cinc. Preferiblemente, para reducir los efectos del oxígeno sobre la vida de PAL, la etapa de PAL se puede llevar a cabo en condiciones anaerobias de manera conocida por la persona experta en la técnica, por ejemplo llevando a cabo la etapa de PAL en una atmósfera de nitrógeno. La persona experta en la técnica puede realizar experimentos normales para escoger las condiciones óptimas de reacción con respecto a – entre otros – temperatura, pH, concentración, y disolventes.

Preferiblemente, la temperatura de la etapa de PAL se escoge de tal manera que la actividad de la PAL escogida sea óptima. Por ejemplo, la temperatura de reacción preferida para la PAL de *R. glutinis* está en el intervalo de 0 a 50°C, en particular de 25 a 45°C, muy en particular de 27 a 37°C.

Preferiblemente, el pH de la etapa de PAL y la concentración del dador de grupos amino (preferiblemente NH_3) se escogen de manera que la actividad de la PAL escogida y la estabilidad de los compuestos (2) y (3), y los rendimientos a los que se obtienen estos compuestos, sean óptimos. Por ejemplo, el pH para la PAL de *R. glutinis* está preferiblemente en el intervalo de pH 8 a pH 14, en particular en el intervalo de pH 10 a 12, más en particular en el intervalo de pH 10,5 a 11,5.

Por ejemplo, la concentración de hidróxido amónico (NH_4OH) en agua para la PAL de *R. glutinis* se escoge entre alrededor de 5 y alrededor de 25% en volumen, en particular de alrededor de 10 a 15% en volumen, muy en particular de alrededor de 12 a 14% en volumen.

La etapa de PAL se puede llevar a cabo, por ejemplo, en amoníaco acuoso, al que opcionalmente se puede añadir un codisolvente, un agente de solubilización, o un aditivo, a fin de potenciar la solubilización del compuesto (3) o para potenciar la actividad o estabilidad de la PAL. Los ejemplos de codisolventes incluyen dimetilformamida, tetrahidrofuracetónitrilo, glutaraldehído, glicerol, tolueno, etanol, acetona, éter y dimetilsulfóxido (DMSO). Los

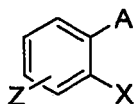
ejemplos de agentes de solubilización incluyen Triton X100 (obtenido por Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wis), Tween-80 (obtenido por Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wis), polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de aditivos incluyen ácido glutámico, isoleucina, etilenglicol y sorbitol.

5 El compuesto (2), según se obtiene en la etapa de PAL, se puede usar directamente en la siguiente etapa, o se puede purificar primero. El compuesto (2) obtenido en la etapa de PAL se puede purificar a partir de la mezcla de reacción obtenida en la etapa de PAL usando métodos convencionales conocidos por la persona experta en la técnica. Por ejemplo, la mezcla de reacción obtenida en la etapa de PAL que comprende el compuesto (2) se puede filtrar o centrifugar (para eliminar las partículas no disueltas, tales como, por ejemplo, las células hospedantes que expresan PAL). Además, el dador de grupos amino, por ejemplo, se puede evaporar, después de lo cual se puede
10 aislar el compuesto (2), preferiblemente por precipitación de (2).

El rendimiento obtenido con la etapa de PAL es preferiblemente al menos 30%, más preferido al menos 40%, incluso más preferido al menos 50%, en particular preferido al menos 60%, más en particular preferido al menos 80%, muy en particular al menos 90%.

15 En una realización preferida del procedimiento (A), el compuesto (S)-fenilalanínico sustituido con cloro en la posición orto según la fórmula (2) (en la que X representa Cl) se prepara haciendo reaccionar el compuesto correspondiente de ácido cinámico sustituido con cloro en la posición 2 de fórmula (3) (en la que X representa Cl) en una disolución acuosa de hidróxido amónico, siendo la concentración de hidróxido amónico en agua de alrededor de 12 a 14% en volumen, en presencia de PAL procedente de *Rhodospiridium toruloides*. Preferiblemente en esta realización del procedimiento (A), la temperatura está entre 25 y 45°C, y el pH oscila desde pH 10,5 a 11,5.

20 El compuesto (3) se puede preparar, por ejemplo, poniendo en contacto un compuesto según la fórmula (4)



(4)

en la que X y Z son como se define anteriormente, y A es un grupo saliente, con un compuesto α,β -insaturado, tal como, por ejemplo, ácido acrílico, un éster acrílico o una amida acrílica, en presencia de un catalizador de metal de transición que comprende un metal de transición y opcionalmente un ligando [Procedimiento (A1)]. Este
25 procedimiento (A1) se lleva a cabo preferiblemente usando una reacción de Heck, tal como se describe, por ejemplo, en M. Larhed., A. Hallberg en *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis* 2002, E. Negishi, Ed., Capítulo IV. 2. En la fórmula (4), A es un grupo saliente, que se puede seleccionar de F, Cl, Br, I, un triflato, un mesilato, un nosilato, un cloruro de carbonilo o un cloruro de sulfonilo, un anhídrido, una sal de yodonio, una sal de diazonio, ácido borónico, y similar. Preferiblemente, A en la fórmula (4) es Cl, Br, I, más preferiblemente Cl o Br.

30 Los compuestos preferidos según la fórmula (4) son 1,2-dibromobenceno, 1-bromo-2-clorobenceno, 1,2-diclorobenceno, 1-bromo-2-yodobenceno, 1-cloro-2-yodobenceno, cloruro de 2-bromo-bencenosulfonilo, cloruro de 2-clorobenzoilo, anhídrido 2-clorobenzoico y cloruro de 2-cloro-bencenosulfonilo.

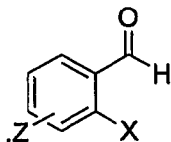
Los compuestos preferidos según la fórmula (3) son ácido 3-(2-bromo-fenil)-acrílico, ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico, éster metílico del ácido 3-(2-bromo-fenil)-acrílico, éster metílico del ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico, éster bencílico del
35 ácido 3-(2-bromo-fenil)-acrílico y éster bencílico del ácido (2-cloro-fenil)-acrílico.

El procedimiento (A1), preferiblemente aplicando una reacción de Heck, está catalizado generalmente por catalizadores metálicos que pueden contener ligandos. Los metales adecuados se pueden escoger del grupo que consiste en paladio, platino, níquel, rodio, rutenio, cobalto, manganeso o hierro. Los metales preferidos son paladio o níquel, más preferido paladio. Los ligandos adecuados se escogen de fosfinas, bisfosfinas, fosfonitos, bisfosfonitos, fosfitos, bisfosfitos, fosforamiditos, bisfosforamiditos, ligandos que contienen nitrógeno tales como biperidina, 1,10-fenantrolina, o ligandos de P, N, que se definen como ligandos que contienen un grupo que contiene fósforo y un grupo que contiene nitrógeno. También se pueden usar los paladaciclos o coloides de paladio. Un repaso adecuado que describe muchos catalizadores diferentes para la reacción de Heck es: Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V.;
40 *Chem. Rev.* 2000, 100, página 3009. El procedimiento (A1) (por ejemplo la reacción de Heck) también se puede llevar a cabo de forma adecuada sin ligandos, e incluso más adecuadamente con cargas bajas de paladio, como se describe por De Vries y colaboradores en *Org. Lett.* 2003, Vol. 5, páginas 3285-3288. La reacción de Heck se puede llevar a cabo en presencia de una base, tal como Et_3N , NaOAc o similar, opcionalmente en un disolvente no prótico dipolar, tal como NMP.

El compuesto (3) también se puede preparar adicionalmente aplicando una reacción de condensación al compuesto
50 (5), tal como por ejemplo una reacción de condensación aldólica, una reacción de Wittig, una reacción de condensación de Perkin, una reacción de condensación de Knoevenagel, u otros procedimientos conocidos por una

persona experta en la técnica [Procedimientos (A2)].

Un procedimiento de condensación adecuado para preparar compuesto (3) es haciendo reaccionar un compuesto según la fórmula (5)



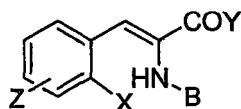
(5)

- 5 en la que X y Z son como se define anteriormente, con un anhídrido, por ejemplo anhídrido de ácido acético, en presencia de una base [Procedimiento (A2)]. Preferiblemente, la sal del ácido correspondiente a dicho anhídrido se usa como la base. Este procedimiento es conocido como la denominada reacción de Perkin, como se describe en *March Advanced Organic Chemistry*, 5ª Edición, Wiley Interscience, Eds, J.M. Smith and J. March, 2001, página 1229.
- 10 Otro método de condensación para preparar el compuesto (3) es poniendo en contacto un compuesto según la fórmula (5) con un derivado de ácido malónico y una base, por ejemplo una amina, en la denominada reacción de condensación de Knoevenagel, como se describe, por ejemplo, en *March Advanced Organic Chemistry*, 5ª Edición, Wiley Interscience, Eds, J.M. Smith and J. March, 2001, página 1225.
- 15 Aún otro método consiste en la condensación de un compuesto de fórmula (5) con acetaldehído en presencia de una base o en presencia de una enzima, tal como, por ejemplo, una aldolasa, seguido de la oxidación con, por ejemplo, oxígeno.

Los compuestos preferidos según la fórmula (5) son 2-bromobenzaldehído o 2-clorobenzaldehído.

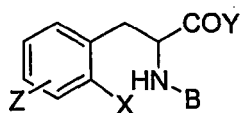
Procedimiento de preparación (B) para formar compuesto (2) enriquecido enantioméricamente

- 20 Según una realización adicional de la presente invención, el compuesto (2) se puede preparar poniendo en contacto un compuesto según la fórmula (6)



(6)

- 25 o una sal del mismo, en la que X, Y y Z son como se define anteriormente, y B es un grupo $-\text{COR}^1$ en el que R^1 puede ser un grupo alifático cíclico o acíclico con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico alifático con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)arilo opcionalmente sustituido, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo sulfonilo opcionalmente sustituido, o similar, con un dador de hidrógeno, en presencia de un catalizador quiral que comprende un metal de transición, con formación de un compuesto según la fórmula (7)



(7)

- 30 o una sal del mismo, en la que X, Y, Z y B son como se define anteriormente, y sometiendo dicho compuesto (7) a una reacción de hidrólisis con formación de un compuesto según la fórmula (2) [Procedimiento (B)].

Los ejemplos adecuados de B en las fórmulas (6) y (7) son formilo, acetilo, cloroacetilo, trifluoroacetilo, fenilacetilo, benzoilo, metilsulfonilo, trifluorosulfonilo, bencenosulfonilo, toluenosulfonilo, *t*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, o similar. Se prefieren formilo, acetilo, trifluoroacetilo, benzoilo, toluenosulfonilo, y *t*-butoxicarbonilo, y más preferiblemente B es acetilo o benzoilo.

- 35 Los compuestos adecuados de fórmula (6) son, por ejemplo, ácido 2-acetilamino-3-(2-clorofenil)-acrílico, éster

5 metílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-clorofenil)-acrílico, ácido 2-acetilamino-3-(2-bromofenil)-acrílico, éster metílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-bromofenil)-acrílico, ácido 2-benzoilamino-3-(2-clorofenil)-acrílico, éster metílico del ácido 2-benzoilamino-3-(2-clorofenil)-acrílico, ácido 2-benzoilamino-3-(2-bromofenil)-acrílico, éster metílico del ácido 2-benzoilamino-3-(2-bromofenil)-acrílico, y similares. Se prefieren el ácido 2-acetilamino-3-(2-clorofenil)-acrílico y el ácido 2-acetilamino-3-(2-bromofenil)-acrílico.

10 Los compuestos adecuados según la fórmula (7) son ácido 2-acetilamino-3-(2-bromo-fenil)-propiónico, ácido 2-acetilamino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico, ácido 2-benzoilamino-3-(2-bromo-fenil)-propiónico, ácido 2-benzoilamino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico, éster metílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-bromo-fenil)-propiónico, éster metílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico, éster bencílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-bromo-fenil)-propiónico, y éster bencílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico. Los compuestos preferidos según la fórmula (7) son ácido 2-acetilamino-3-(2-bromo-fenil)-propiónico y ácido 2-acetilamino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico.

15 La parte de este procedimiento en la que se prepara el compuesto (7) es conocida como un proceso de hidrogenación (transferencia) asimétrica, en el que un compuesto (7) enriquecido enantioméricamente se prepara usando un catalizador de metal de transición quiral que comprende al menos un ligando enriquecido enantioméricamente, para asegurarse de que el doble enlace de un compuesto proquiral (compuesto (6) en este procedimiento particular) se reduce asimétricamente a través de transferencia de hidrógeno con un compuesto orgánico dador de hidrógeno (definido aquí como el dador de hidrógeno).

20 Los catalizadores quirales adecuados para la hidrogenación (transferencia) asimétrica comprende un compuesto de complejo de metal de transición de un ligando quiral L enriquecido enantioméricamente, opcionalmente un contraion y opcionalmente un ligando S adicional, siendo este último quiral o no quiral.

Los metales de transición que se pueden usar de forma adecuada en el proceso de hidrogenación de transferencia asimétrica de la presente invención son metales escogidos de los grupos 8, 9 y 10 de la Tabla Periódica de los Elementos, tales como, por ejemplo, paladio, rutenio, rodio e iridio; son más preferidos rutenio y rodio.

25 Los ligandos L quirales que se pueden usar son bidentados, por ejemplo bisfosfinas enriquecidas enantioméricamente, por ejemplo DIOP, BINAP, CHIRAPHOS, BICP, DIPAMP, SKEWPHOS, TANIAPHOS, JOSIPHOS, BPPM y similares, bisfosfinitos enriquecidos enantioméricamente, por ejemplo spirOP, BICPO y similares, bisfosfonitos y bisfosfitos, todos los cuales se describen en Noyori et al. en *Catalytic Asymmetric Synthesis*, Ed I. Ojima, Capítulo 1, que se incorpora aquí como referencia.

30 Como alternativa, se pueden usar ligandos monodentados, por ejemplo fosforamiditos como se describe en el documento WO 02/04466, incorporándose aquí la preparación y sus usos como referencia, fosfitos y fosfonitos como se describe en T. Jerphagnon, J. L. Renaud y C. Bruneau, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, Vol. 15, páginas 2101-2111, en De Vries et al., *Adv. Synth. Catal.* 2003, Vol. 345, páginas 308-323 y en Blaser et al. *Adv. Synth. Catal.* 2003, Vol. 345, páginas 103-151. En caso de que se usen ligandos monodentados, es posible usar una mezcla de dos ligandos monodentados enantioenriquecidos quirales diferentes. También es posible usar una mezcla de un ligando monodentado quiral y un ligando no quiral, tal como trifenilfosfina. También es posible usar otros ligandos que contienen dos átomos de nitrógeno, o un átomo de nitrógeno y un átomo de fósforo, como átomos dadores (véase, por ejemplo, A. Pfaltz et al en *Adv. Synth. Catal.*, 2003, Vol. 345, páginas 33-43.

40 La parte diólica y/o la parte amínica del ligando monodentado quiral se puede enriquecer enantioméricamente en el caso de fosforamiditos; la parte diólica y/o la parte alcohólica se puede enriquecer enantioméricamente en el caso de fosfitos; la parte diólica y/o la parte hidrocarbonada se puede enriquecer enantioméricamente en el caso de fosfonitos. Obviamente, un enantiómero del ligando dará el compuesto (7) con una cierta configuración (R) o (S), mientras que el enantiómero opuesto del ligando puede dar el compuesto (7) con la configuración opuesta (S) o (R). Preferiblemente, se usa un catalizador quiral que es capaz de convertir preferentemente el compuesto (6) en el enantiómero (S) del compuesto (7). Adicionalmente, el propio metal puede ser igualmente ópticamente activo.

45 Se hace uso preferiblemente de ligandos monodentados quirales L enriquecidos enantioméricamente que tienen la fórmula (I),



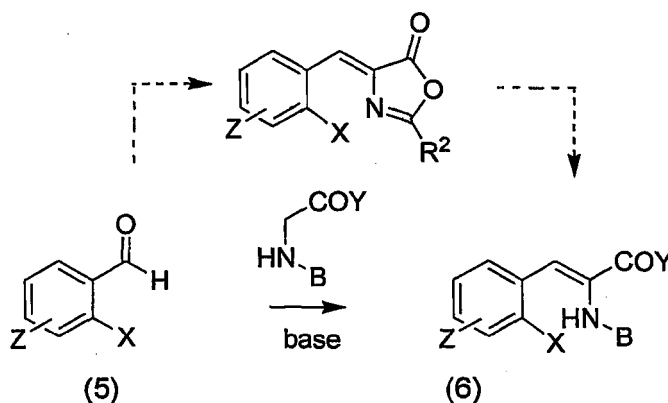
50 en la que C_n, junto con los dos átomos de O y el átomo de P, forma un anillo con 2-6 átomos de C sustituido o no sustituido, Q representa OR o NR¹R², en el que R, R¹ y R² representan, cada uno independientemente, hidrógeno, un grupo alquilo, arilo, aralquilo o alcarilo opcionalmente sustituido, o pueden formar un anillo opcionalmente heterocíclico junto con el átomo de N al que están unidos.

- En el ligando quiral L de fórmula (I), C_n y/o R, R^1 y/o R^2 son quirales, o una parte de una entidad quiral. C_n representa preferiblemente una cadena de C_4 sustituida quiral (cadena con 4 átomos de carbono opcionalmente sustituidos), de predominantemente una configuración, por ejemplo con un exceso enantiomérico mayor que 95%, en particular mayor que 99%, más en particular mayor que 99,5%. Preferiblemente, C_n , junto con los dos átomos de oxígeno y el átomo de fósforo, forma un anillo de 7 miembros con 4 átomos de carbono los cuales 2 por 2 forman parte de un grupo arilo o un grupo naftilo.
- Preferiblemente, la enantioselectividad (e.e.) del catalizador quiral usado para el proceso de hidrogenación asimétrica (B) para convertir el compuesto (6) en el compuesto (7) es al menos 85%, más preferido al menos 90%, incluso más preferido al menos 95%, particularmente preferido al menos 98%, y lo más preferido al menos 99%.
- En los documentos WO 02/04466 y WO 01/94278, cuyos ejemplos se incorporan aquí como referencia, se describen ejemplos de ligandos monodentados quirales adecuados de fórmula (I).
- Como disolvente, se puede hacer uso de: alcoholes, ésteres, amidas, éteres, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos halogenados, o similares. Se prefieren acetato de etilo, acetato de isopropilo, metil-t-butiléter, tetrahidrofurano, tolueno, acetona, metilisobutilcetona y diclorometano; son muy preferidos acetato de etilo y diclorometano. También es posible llevar a cabo la hidrogenación (transferencia) asimétrica en líquidos iónicos, como se describe en T. Welton, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2071-2083, de manera que se simplifica el aislamiento del producto. Si es necesario, la solubilidad del ligando en el líquido iónico se puede incrementar proporcionando el ligando con grupos polares tales como sales de carboxilato.
- Cuando se usan fosoramiditos como ligando (cuando Q en la fórmula (I) = NR^1R^2), el proceso de hidrogenación asimétrica se puede acelerar opcionalmente incrementando la presión. La presión puede estar entre 1 y 100 bares, más preferido entre 2 y 80 bares, y lo más preferido de 3 a 60 bares.
- La temperatura a la que se lleva a cabo la hidrogenación (transferencia) asimétrica es generalmente un compromiso entre la velocidad de reacción y la enantioselectividad, y está preferiblemente entre -20 y 120°C, en particular entre 0 y 60°C. La hidrogenación (transferencia) asimétrica se lleva a cabo preferiblemente excluyéndose el oxígeno. Preferiblemente, los sustratos y disolventes no contienen oxígeno, peróxidos u otras sustancias oxidantes.
- En el proceso de hidrogenación de transferencia asimétrica (Procedimiento (B)) de la invención, el doble enlace proquiral del compuesto (6) se reduce asimétricamente a través de una transferencia de hidrógeno en presencia de uno o más dadores de hidrógeno, que, en el contexto de esta invención, se entiende que son compuestos que pueden en cierta manera transferir hidrógeno al sustrato. Los dadores adecuados de hidrógeno que se pueden usar son preferiblemente H_2 – en cuyo caso el proceso se define como un proceso de hidrogenación asimétrica -, pero también pueden ser alcoholes alifáticos o aromáticos con 1-10 átomos de carbono, en particular alcoholes secundarios con 1-10 átomos de carbono, por ejemplo isopropanol o ciclohexanol, o hidrocarburos insaturados con 5-10 átomos de carbono, por ejemplo 1,4-dihidrobenceno o hidroquinona, azúcares reductores, por ejemplo glucosa o derivados de ácido fórmico, por ejemplo formiato de amonio o una mezcla azeotrópica de ácido fórmico y trietilamina. Preferiblemente, se usan ácido fórmico, isopropanol o ciclohexadieno.
- La relación molar de sustrato (compuesto (6)) a dador de hidrógeno está preferiblemente entre 1:1 y 1:100. La presión de hidrógeno puede variar dentro de límites amplios, y se escoge preferiblemente para que sea tan alta como sea posible cuando se desee una reacción rápida o la cantidad más baja posible de catalizador. Por ejemplo, la presión de hidrógeno está entre 0,05 y 20 MPa, preferiblemente entre 0,1 y 10 MPa, en particular entre 0,15 y 8 MPa.
- En la hidrogenación asimétrica del compuesto (6), se hace uso preferiblemente de una relación molar de metal presente en el compuesto de metal de transición a compuesto (6), el sustrato, de entre 1:10 y 1:1.000.000, en particular entre 1:50 y 1:100.000.
- El rendimiento obtenido con el proceso de hidrogenación asimétrica que convierte el compuesto (6) en el compuesto (7) es preferiblemente al menos 50%, más preferido al menos 70%, incluso más preferido al menos 80%, particularmente preferido al menos 90%, y muy preferido al menos 95%.
- Preferiblemente, durante el proceso de hidrogenación asimétrica de la invención, el compuesto (7) se puede obtener con una pureza enantiomérica (e.e.) de al menos alrededor de 50%, más preferido al menos alrededor de 75%, incluso más preferido al menos alrededor de 85%, particularmente preferido al menos alrededor de 95%, y muy preferido al menos alrededor de 98%.
- Según este procedimiento de preparación particular (B), el compuesto (7) se puede someter a una reacción de hidrólisis, por ejemplo poniendo en contacto el compuesto (7) con un ácido, por ejemplo mediante tratamiento con HCl, H_2SO_4 , ácido acético o ácido p-toluenosulfónico, o poniendo en contacto el compuesto (7) con una base, por ejemplo NaOH, Na_2CO_3 o K_2CO_3 , o mediante tratamiento del compuesto (7) con una enzima, por ejemplo con una acilasa o similar, para dar un compuesto según la fórmula (2). Las conversiones del compuesto (7) en el compuesto

(2) se pueden realizar de manera conocida por la persona experta en la técnica, por ejemplo como se describe en *J. Am. Chem. Soc.* 1988, Vol. 110, páginas 6162-6172 y en *J. Org. Chem.* 1990, Vol. 55, páginas 6000-6017, y en *J. Org. Chem.* 1984, Vol. 49, páginas 2819-2820.

- 5 Como disolventes para la reacción de hidrólisis, se pueden usar disolventes orgánicos o agua, por ejemplo alcoholes o ésteres. Se prefiere el agua debido a que la siguiente etapa, la conversión del compuesto (2) en el compuesto (1), también se puede llevar a cabo en el mismo disolvente, disolvente el cual es en particular medioambientalmente inocuo y es barato.

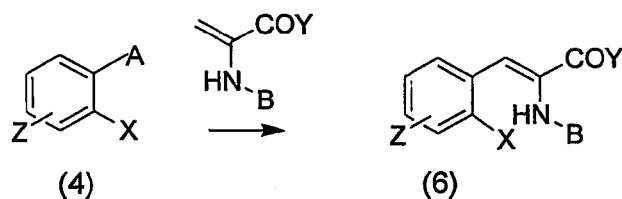
- 10 El compuesto según la fórmula (6) se puede preparar poniendo en contacto un compuesto según la fórmula (5) con un derivado de glicina N-funcionalizado que tiene la fórmula B-NH-CH₂-COY, en la que Y es como se define anteriormente, y convirtiendo un compuesto de azlactona opcionalmente formado como intermedio en el compuesto de fórmula (6) [Procedimiento (B1)]:



Los derivados de glicina N-funcionalizados preferidos son ácido de glicina N-funcionalizada, éster de glicina N-funcionalizada, y amida de glicina N-funcionalizada.

- 15 Los procedimientos (B1) típicos para convertir el compuesto (5) en el compuesto (6) son conocidos por una persona experta en la técnica, y se describen por ejemplo en Laneman et al. en *Chem. Ind.* 1998, 75 y en Jendrella et al. *Tetrahedron* 1995, Vol. 51, páginas 12047-12068, ambos incorporados aquí como referencia. Este procedimiento se puede aplicar, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (5) con dicho derivado de glicina N-funcionalizado, en presencia de acetato de sodio y anhídrido de ácido acético. La hidrólisis del compuesto azlactónico intermedio, cuando se forma, se puede realizar con un ácido o una base, por ejemplo usando ácido acético en agua, o mediante hidróxido metálico, tal como, por ejemplo, hidróxido sódico en agua.

- 25 Un compuesto según la fórmula (6) también se puede preparar haciendo reaccionar un compuesto según la fórmula (4) con un derivado de acrilato funcionalizado, preferiblemente un derivado de enamida acrílica, tal como, por ejemplo, una enamida de ácido acrílico, una enamida de éster acrílico o una enamida de amida acrílica [Procedimiento (B2)]. Preferiblemente, se puede aplicar una reacción de Heck, tal como, por ejemplo, descrita por Willans, de Vries et al. en *J. Organomet. Chem.* 2003, Vol. 687, páginas 494-497:



- 30 La reacción se lleva a cabo generalmente como se describe anteriormente para la reacción de Heck. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador de metal de transición. Opcionalmente, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de una base, opcionalmente en un disolvente, preferiblemente un disolvente orgánico. Una enamida de éster acrílico adecuada puede ser éster metílico de la N-acetilglicina, que se puede poner en contacto con, por ejemplo, 2-clorobromobenceno en presencia de, por ejemplo, Pd(OAc)₂ y opcionalmente una base, tal como, por ejemplo, acetato de sodio o diisopropilamina, por ejemplo en NMP como disolvente, para dar éster metílico del ácido 2-acetilamino-3-(2-clorofenil)-acrílico según la fórmula (6).

Procedimientos de preparación (C) para formar compuesto (2) enriquecido enantioméricamente

Una manera adecuada adicional para preparar el compuesto (2) es usando un procedimiento de resolución clásico [Procedimiento (C1)]. Tal procedimiento comprende hacer reaccionar una mezcla de reacción, que comprende ambos enantiómeros del compuesto según la fórmula (2), con un agente de resolución adecuado. Por ejemplo, en el caso cuando Y es H, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono sustituido o no sustituido, o un grupo ariloxi sustituido o no sustituido, la mezcla de reacción se puede poner en contacto con un agente de resolución ácido, tal como, por ejemplo, ácido tartárico, ácido mandélico o ácido canfosulfónico, con formación de una sal diastereómera de uno de los enantiómeros del compuesto (2) con dicho agente de resolución. Esto se puede realizar mediante métodos como se describe, por ejemplo, en "Stereochemistry of Organic Compounds" Wiley Interscience, Eds. Eliel E., Wilen S.H., 1994, Capítulo 7. Los diastereómeros formados se pueden separar vía cristalización, y el compuesto (2) enriquecido enantioméricamente requerido se puede aislar tras la separación a partir de la sal diastereómera.

Como alternativa, se puede aplicar un procedimiento de resolución clásico a dicha mezcla racémica de los enantiómeros del compuesto (2) o compuesto (7), respectivamente, en los que Y es hidroxilo y B es como se define anteriormente, usando un agente de resolución básico, tal como por ejemplo efedrina, α -feniletilamina, o quinina, como se describe por ejemplo por L.R. Overby y A.W. Ingersoll, *J. Am. Chem. Soc.* 1960, Vol. 81, páginas 2067-2069. Los diastereómeros formados se pueden separar vía cristalización, y el compuesto (2) o el compuesto (7) enriquecido enantioméricamente requerido se puede aislar después de la separación a partir de la sal diastereómera. En caso de resolución del compuesto (7), ya sea mediante un agente de resolución ácido o básico, el compuesto (7) enriquecido enantioméricamente obtenido se somete subsiguientemente a una reacción de hidrólisis como se describe anteriormente, para dar el compuesto (2).

La mezcla racémica de ambos enantiómeros del compuesto (2) o (7) se puede preparar según cualquiera de los métodos (B) anteriores, cuando se lleva a cabo de manera no estereoselectiva.

La mezcla racémica de compuesto (2) también se puede preparar mediante condensación de un compuesto según la fórmula (5) con una hidantoína, seguido de la hidrogenación del compuesto bencilidénico intermedio formado y de la hidrólisis de la hidantoína obtenida con métodos químicos o enzimáticos conocidos por una persona experta en la técnica, por ejemplo como se describe por S.G. Burton y colaboradores en *Tetrahedron Asymmetry*, 2004, vol. 15, páginas 2737-2741 [Procedimiento (C2)].

Procedimientos de preparación (D) para formar compuesto (2) enriquecido enantioméricamente

Otra forma adecuada para preparar un compuesto (2) enriquecido enantioméricamente es aplicar un procedimiento de resolución enzimática a una mezcla de reacción que comprende ambos enantiómeros del compuesto (7) [Procedimiento (D)]. Por ejemplo, mediante hidrólisis enzimática del enlace N-B en uno de los enantiómeros de un compuesto de fórmula (7) usando, por ejemplo, una acilasa, con lo que se forma una mezcla de un enantiómero de compuesto (2) y el enantiómero opuesto del compuesto (7), seguido de la separación de dicho enantiómero del compuesto (2) a partir de dicha mezcla. Otro método es mediante hidrólisis enzimática del enlace C-Y del compuesto (2) o (7) en el caso de que Y es NH_2 , usando, por ejemplo, una amidasa [Procedimiento (D1)]. Otro método es mediante hidrólisis enzimática del enlace C-Y del compuesto (2) o (7) en el caso de que Y es NH_2 , usando, por ejemplo, una amidasa [Procedimiento (D1)].

Otra manera adecuada es mediante hidrólisis enzimática del enlace C-Y de compuestos (2) y/o (7), en el caso cuando Y es un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono sustituido o no sustituido, o un grupo ariloxi sustituido o no sustituido, usando, por ejemplo, una lipasa, como se describe por Roper y colaboradores, *Synthesis* 1983, página 1041 [Procedimiento (D2)].

Otra forma adecuada es poniendo en contacto una mezcla que comprende ambos enantiómeros de respectivamente el compuesto (2) o el compuesto (7) con una enzima PAL para convertir uno de los enantiómeros de los compuestos (2) o (7) en un compuesto de fórmula (3), y separando el otro enantiómero del compuesto (2), respectivamente (7), a partir de dicho compuestos (3). [Procedimiento (D3)].

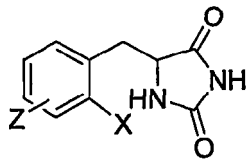
Otra manera adecuada es poniendo en contacto una mezcla que comprende ambos enantiómeros de respectivamente el compuesto (2) o (7) con una aminotransferasa para convertir uno de los enantiómeros en un compuesto de fórmula (9), y obtener los compuestos (2) o (7) enriquecidos enantioméricamente [Procedimiento (D4)].

En el caso en el que se obtenga un compuesto (7) enriquecido enantioméricamente según el procedimiento (D), dicho compuesto (7) se puede someter subsiguientemente a una reacción de hidrólisis como se describe anteriormente para dar el compuesto (2).

Otros procedimientos de preparación (E) – (G) para formar compuesto (2) enriquecido enantioméricamente

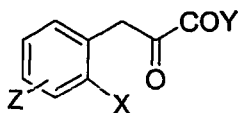
Una forma adecuada adicional para preparar compuesto (2) es mediante hidrólisis enzimática de una hidantoína de

fórmula (8) usando una enzima hidantoinasa [Procedimiento (E)]:



(8)

- 5 Otra forma adecuada para preparar compuesto (2) es aplicar aminación reductora enzimática, es decir, poner en contacto un α -cetoácido, α -cetoéster o α -cetoamida de fórmula (9), o una sal de los mismos, con, por ejemplo, amoníaco en presencia de una enzima [Procedimiento (F)]:



(9)

Otra manera adecuada para preparar compuesto (2) es usando una aminotransferasa, es decir, poniendo en contacto un α -cetoácido, α -cetoéster o α -cetoamida de fórmula (9) con un dador de grupos amino, por ejemplo glutamato o alanina, en presencia de una enzima aminotransferasa [Procedimiento (G)].

- 10 Otros procedimientos adecuados para preparar compuesto (2) son conocidos por una persona experta en la técnica, por ejemplo como se describe en *Chemistry of the Amino Acids*, Eds Greenstein J.P. Winitz M. Vol. 3, Krieger Publishing Company Inc., 1984, capítulo 34.

Preferiblemente, las etapas del procedimiento para preparar compuesto (1) se llevan a cabo sin aislamiento o purificación de los compuestos intermedios (2-9).

- 15 La invención se elucidará en base a los ejemplos, sin estar sin embargo limitada por ellos.

Ejemplos

Definiciones

C_{final} = número de moles de producto (1) formado al final de la reacción.

D_0 = número de moles de sustrato (2) al comienzo de la reacción.

- 20 D_f = número de moles de sustrato (2) al final de la reacción.

El rendimiento (5) se puede definir mediante la fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = C_{\text{final}}/D_0 * 100 \quad (4)$$

La conversión (%) se puede definir mediante la fórmula (5):

$$\text{Conversión (\%)} = (D_0 - D_f)/D_0 * 100 \quad (5)$$

- 25 La selectividad se puede definir mediante la fórmula (6):

$$\text{Selectividad (\%)} = (\text{rendimiento}/\text{conversión}) * 100 \quad (6)$$

Ejemplo 1

Ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico: Conversión de (S)-2-bromofenilalanina con 2% en moles de CuCl en NMP a 100°C

- 30 Un matraz se cargó sucesivamente con 366 mg (1,5 mmoles) de (S)-2-bromofenilalanina, 217 mg (1,6 mmoles) de K_2CO_3 , 3,2 mg (0,03 mmoles) de CuCl y 3,2 g de NMP. El reactor se inundó con argón, y después se mantuvo bajo una corriente lenta de argón. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 100°C, y se mantuvo a esta temperatura. Se tomaron muestras regularmente, y se analizaron mediante HPLC. Después de 4 horas, se encontró una conversión total de (S)-2-bromofenilalanina. El rendimiento (medido en disolución) de ácido (S)-2,3-dihidro-1H-
- 35 indol-2-carboxílico fue 95,9 %, ee > 98,6%.

Ejemplo 2

Ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico: Conversión de (S)-2-bromofenilalanina con 1% en moles de CuCl en NMP a 80°C

5 Un matraz se cargó sucesivamente con 9,76 g (40,0 mmoles) de (S)-2-bromofenilalanina, 5,80 g (42,0 mmoles) de K₂CO₃, 40 mg (0,4 mmoles) de CuCl y 40 g de NMP. El reactor se inundó con argón, y después se mantuvo bajo una corriente lenta de argón. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 80°C, y se mantuvo a esta temperatura. Se tomaron muestras regularmente, y se analizaron mediante HPLC. Después de 3,5 h, se encontró una conversión total de (S)-2-bromofenilalanina. La mezcla de reacción se enfrió hasta 25°C, y después se añadieron 40 ml de H₂O y 50 ml de EtOAc acuoso. El pH de esta mezcla se ajustó hasta 3,3 con 3,5 g de HCl acuoso al 37%. Las fases se separaron. La fase de H₂O se extrajo con 2 x 50 ml de EtOAc acuoso. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 25 ml de NaCl acuoso sat. Después, la fase orgánica se concentró. El residuo se disolvió en 16 ml de HCl 5N, seguido del ajuste del pH hasta 2,1 con 9,4 g de NaOH acuoso al 32%. El ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con 2 x 10 ml de H₂O. Se encontraron 3,24 g (19,8 mmoles) de ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico después de secar. Rendimiento 49,5%, ee >99%.

15 Ejemplo 3

Ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico: Conversión de (S)-2-bromofenilalanina con 2% en moles de CuCl en agua a 95°C

20 Un matraz se cargó sucesivamente con 366 mg (1,5 mmoles) de (S)-2-bromofenilalanina, 217 mg (1,6 mmoles) de K₂CO₃, 3 mg (0,03 mmoles) de CuCl y 3,4 g de H₂O. El reactor se inundó con argón, y después se mantuvo bajo una corriente lenta de argón. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 95°C, y se mantuvo a esta temperatura. Se tomaron muestras regularmente, y se analizaron mediante HPLC. Después de 2 horas, se encontró la conversión total de (S)-2-bromofenilalanina. La mezcla de reacción se enfrió hasta 25°C y se analizó mediante HPLC. El rendimiento en disolución de ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico fue 81,1 %, ee > 99%.

Ejemplo 4

25 Ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico: Conversión de (S)-2-bromofenilalanina con 0,01% en moles de CuCl en agua a 95°C

30 Un matraz se cargó sucesivamente con 4,89 g (20,0 mmoles) de (S)-2-bromofenilalanina, 2,93 g (21,2 mmoles) de K₂CO₃, 0,2 mg de CuCl (2,9 mmoles) y 39,7 g H₂O. El reactor se inundó con argón, y después se mantuvo bajo una corriente lenta de argón. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 95°C, y se mantuvo a esta temperatura. Se tomaron muestras regularmente, y se analizaron mediante HPLC. Después de 4 h se encontró una conversión total de (S)-2-bromofenilalanina. La mezcla de reacción se enfrió hasta 25°C. Después, la mezcla de reacción se acidificó con 4,47 g de HCl acuoso 5M hasta pH = 4,4. El ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico precipitado se aisló mediante filtración, y se lavó con 2 x 10 ml de H₂O. Después de secar, se encontraron 2,24 g (13,7 mmoles) de ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico. Rendimiento 69%, ee >99%.

35 Ejemplo 5

Ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico: Conversión de (S)-2-bromofenilalanina sin CuCl en agua a 95°C

40 Un matraz se cargó sucesivamente con 366 mg (1,5 mmoles) de (S)-2-bromofenilalanina, 217 mg (1,6 mmoles) de K₂CO₃ y 3 g de H₂O. El reactor se inundó con argón, y después se mantuvo bajo una corriente lenta de argón. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 95°C, y se mantuvo a esta temperatura. Se tomaron muestras regularmente, y se analizaron mediante HPLC. Después de 5 horas, la conversión fue aproximadamente 37%. Después de 22 h, se encontró una conversión total de (S)-2-bromofenilalanina. La mezcla de reacción se enfrió hasta 25°C, y se analizó mediante HPLC. El rendimiento en disolución de ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico fue 95,6 %, ee > 99%.

Ejemplo 6

45 Etapa (i) Preparación de ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico (compuesto (3))

50 Una mezcla de 18,4 g (0,19 moles) de acetato de potasio en 70,3 g (0,5 moles) de 2-clorobenzaldehído se calentó hasta 145°C. Después, se añadieron 76,5 g (0,75 moles) de anhídrido acético en 1 hora. Después de dosificar 0,50 moles de anhídrido acético, la mezcla se puso transparente. La mezcla se agitó a 145°C durante 18 horas. La mezcla de reacción caliente se vertió en una mezcla de 670 g de NaOH acuoso al 6,4% p/p (1,1 moles, 2,1 eq basados en 2-clorobenzaldehído) y 200 ml de tolueno a 80°C. El pH final fue 7,4. Después de la separación de la fase orgánica, la capa de agua se extrajo nuevamente con 100 ml de tolueno a 80°C. Las fases acuosas combinadas se acidificaron con 380 g de H₂SO₄ al 25% p/p hasta pH 4,6. La cristalización comienza a pH 6,4. La mezcla se enfrió hasta 25°C, y el producto se aisló por filtración, se lavó con 100 ml de agua, y se secó (vacío,

50°C). Se obtuvo ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico como un sólido blanquecino (100,2 g, 0,55 moles, rendimiento 55%).

Etapa (ii): Preparación de ácido (S)-2-amino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico

El gen de PAL de *R. glutinis* se sintetizó por Genscript Corporation, Scotch Plains, USA, según la secuencia proteica de la PAL de *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788, secuencia la cual está listada en la base de datos de proteínas del NCBI con el número CAA31209. Los codones del gen sintético de PAL se optimizaron para la expresión en *E. coli*. El gen sintetizado se ligó en el sitio de *Sma*I de pUC57 por Genscript para dar el constructo pUC57_PAL. El plásmido liofilizado (5 µg) (obtenido de Genscript) se disolvió en 50 µl de agua MilliQ, y 1 se usó 1 µl de esta disolución para transformar una alícuota de células químicamente competentes de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Breda, Países Bajos) según el protocolo del proveedor. Después del crecimiento durante la noche sobre medio LB sólido (10 g/l de triptona Bacto Trypton (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 5 g/l de extracto de levadura Bacto Yeast Extract (Difco) y 5 g/l de cloruro sódico (Merck, Darmstadt, Alemania) suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina (Sigma, St. Louis, MO, USA), a 37°C, se transfirió una colonia a 20 ml de medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de carbenicilina. Se prepararon lotes en glicerol (concentración final de glicerol de 8%) de este cultivo, y se almacenaron a -80°C.

Se inoculó *E. coli* DH5α, que contiene el constructo pUC57_PAL según se obtiene anteriormente, en 1000 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina, y se hizo crecer toda la noche a 28°C. Este cultivo se usó para inocular 10 litros de medio TB (12 g/l de triptona Bacto Trypton, 24 g/l de extracto de levadura Bacto Yeast Extract, 2,31 g/l de KH₂PO₄ (Merck), 12,54 g/l de K₂HPO₄ (Merck), y 4 g/l de glicerol (Sigma), pH 7,0, suplementado con 0,1 g/l de carbenicilina e IPTG (concentración final 1 mM). Las células se fermentaron durante 9,5 horas a 37°C a una velocidad del agitador de 500 a 1500 rpm. Las células se cosecharon mediante centrifugación. Se obtuvo un rendimiento total de 230 gramos de células. Estas células se almacenaron como alícuotas de 10 gramos a -20°C.

Antes del experimento, se descongeló en agua fría la cantidad apropiada de células, y se resuspendió en una disolución de reacción adecuada.

Se disolvieron 1,8 g (10 mmoles) de ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico en 0,5 l de NH₃ acuoso al 13 % en volumen, y el pH se ajustó hasta 11 con H₂SO₄ acuoso al 25% p/p (disolución sustrato). Después, se resuspendieron 130 g (peso húmedo) de células de *E. coli*, que contienen el gen de fenilalanina amonio liasa de *R. glutinis* (*E. coli* DH5α que contiene el plásmido pUC57_PAL), en 0,2 l de amoníaco acuoso al 13% en volumen (pH ajustado a 11 con H₂SO₄ acuoso al 25% p/p). La suspensión celular se añadió a la disolución sustrato, y el volumen se ajustó a 1 l con amoníaco acuoso al 13% en volumen. La reacción se agitó con 200 rpm a 30°C en una vasija cerrada. Durante la 1ª hora, se añadieron al medio de reacción 0,91 g (5,0 mmoles) de ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico cada 5 minutos. Después, la alimentación se continuó con adición de 0,91 g (5 mmoles) de ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico cada 25 minutos durante otras 7 h. Después de un tiempo total de reacción de 8,5 h, las células se eliminaron mediante centrifugación.

El rendimiento de la reacción (determinado usando HPLC) fue aproximadamente 91%. La mezcla de reacción contenía aproximadamente 18,1 gramos (91 mmoles) de 2-clorofenilalanina.

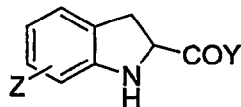
El sobrenadante (850 ml, pH 10,8) se concentró a presión reducida (150 a 10 mbares; temperatura del baño: 60°C). Después de eliminar alrededor de 65% del agua, se formó una gran cantidad de precipitado (pH 7,5). El precipitado se eliminó mediante filtración, y se agitó en agua para eliminar las sales inorgánicas. El material sólido resultante se secó para dar 14,9 g de producto. Este producto contenía 57% p/p de ácido (S)-2-amino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico (8,5 g, 47% de rendimiento), 24% p/p de agua y 1,7% p/p de ácido 3-(2-cloro-fenil)-acrílico. El e.e. del ácido (S)-2-amino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico fue 99%. El licor madre contenía los restantes 9,5 g de ácido (S)-2-amino-3-(2-clorofenil)-propiónico.

Etapa (iii): Ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico: Conversión de ácido (S)-2-amino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico con 1% en moles de CuCl en agua a 95°C

Un matraz se cargó sucesivamente con 3,00 g (15,0 mmoles) de ácido (S)-2-amino-3-(2-cloro-fenil)-propiónico, 2,17 g (15,7 mmoles) de K₂CO₃, 15 mg de CuCl (2,9 mmoles) y 15 g de H₂O. El reactor se inundó con argón, y después se mantuvo bajo una corriente lenta de argón. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 95°C, y se mantuvo a esta temperatura durante 22 h. Se tomaron muestras regularmente, y se analizaron mediante HPLC. La conversión después de 22 h fue aproximadamente 40%. Después, se añadieron 15 ml de agua, y la mezcla se agitó y se calentó durante 18 h adicionales. La HPLC indicó una conversión total de (S)-2-clorofenilalanina. La mezcla de reacción se enfrió hasta aprox. 25°C. El pH de la disolución se disminuyó entonces desde 7,6 hasta aprox. 3,5. El ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico precipitado se aisló mediante filtración y se lavó con 2 x 10 ml de HCl 0,01 M. Después de secar, se encontraron 1,88 g (11,5 mmoles) de ácido (S)-2,3-dihidro-1H-indol-2-carboxílico. Rendimiento 76,6 %, ee > 99%.

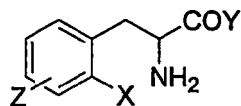
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un ácido indolin-2-carboxílico opcionalmente sustituido enriquecido enantioméricamente según la fórmula (1)



(1)

- 5 o una sal del mismo, en la que Y es un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono sustituido o no sustituido, un grupo ariloxi sustituido o no sustituido, o un resto amínico, y en la que Z representa uno o más sustituyentes sobre un grupo aromático que se escogen del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alifático cíclico o acíclico con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico alifático con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)arilo opcionalmente sustituido, un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un átomo de halógeno, un grupo amina, un grupo nitro, un ácido carboxílico, un éster carboxílico, una amida carboxílica, nitrilo y grupo trifluorometilo, en el que un compuesto fenilalanínico quiral sustituido con X en posición orto enriquecido enantioméricamente según la fórmula (2)



(2)

- 15 o una sal del mismo, en la que Y y Z son como se define anteriormente, y X es un grupo saliente, se somete a ciclación a una temperatura por debajo de alrededor de 140°C, con formación del compuesto de ácido indolin-2-carboxílico enriquecido enantioméricamente, según la fórmula (1).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que X se escoge del grupo que consiste en cloruro, bromuro, yoduro, y un grupo mesilato.

- 20 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que Z es hidrógeno, Y es hidroxilo, y el ácido indolin-2-carboxílico según la fórmula (1) está enriquecido enantioméricamente en el enantiómero (S).

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un catalizador metálico que comprende un átomo o ion de metal de transición seleccionado de los grupos 8 a 11 de la Tabla Periódica de los Elementos.

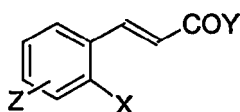
- 25 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el catalizador metálico comprende al menos un átomo o sal de de cobre metálico.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el procedimiento se lleva a cabo en ausencia de un ligando.

- 30 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la reacción de ciclación se lleva a cabo en un disolvente orgánico, en agua, en un líquido iónico, o en una mezcla de dos o más de los mismos.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la reacción de ciclación se lleva a cabo en presencia de una base.

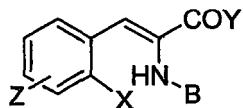
- 35 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el compuesto (2) enriquecido enantioméricamente se prepara a partir del derivado de ácido cinámico sustituido con X en posición orto correspondiente de fórmula (3)



(3)

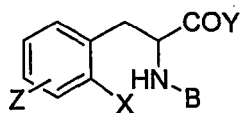
o una sal del mismo, en la que X, Y y Z son como se define anteriormente, haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (3) con un dador de grupos amino en presencia de una fenilalanina amonio liasa (PAL) estereoselectiva [Procedimiento (A)].

- 5 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el compuesto (2) enriquecido enantioméricamente se prepara poniendo en contacto un compuesto de fórmula (6)



(6)

- 10 o una sal del mismo, en la que X, Y y Z son como se define anteriormente, y B es un grupo $-COR^1$ en el que R^1 es un grupo alifático cíclico o acíclico con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico alifático con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, un grupo (hetero)arilo opcionalmente sustituido, o un grupo alcoxi con 1-10 átomos de carbono opcionalmente sustituido, con un dador de hidrógeno en presencia de un catalizador quiral que comprende un metal de transición, con formación de un compuesto según la fórmula (7)



(7)

o una sal del mismo, en la que X, Y, Z y B son como se define anteriormente, y sometiendo a dicho compuesto (7) a una reacción de hidrólisis con formación de un compuesto según la fórmula (2) [Procedimiento (B)].