

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 793**

51 Int. Cl.:

A61K 31/403 (2006.01)

C07D 209/02 (2006.01)

C07C 62/06 (2006.01)

C07C 229/28 (2006.01)

C07C 271/22 (2006.01)

C07D 207/22 (2006.01)

C07D 209/52 (2006.01)

C07C 69/635 (2006.01)

C07C 69/675 (2006.01)

C07C 69/757 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2003** **E 12162624 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 2517706**

54 Título: **Procedimientos y compuestos de producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV e intermedios de los mismos**

30 Prioridad:

09.12.2002 US 431814 P

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

16.09.2014

73 Titular/es:

ASTRAZENECA AB (100.0%)
151 85 Södertälje, SE

72 Inventor/es:

VU, TRUC CHI;
BRZOWSKI, DAVID B.;
HANSON, RONALD L.;
KOLOUCHIN, SERGEI V.;
MAZZULLO, JOHN A. JR.;
WANG, JIANJI;
WONG, KWOK;
YU, JURONG y
ZHU, JASON

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 494 793 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

Procedimientos y compuestos de producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV e intermedios de los mismos

Campo de la invención

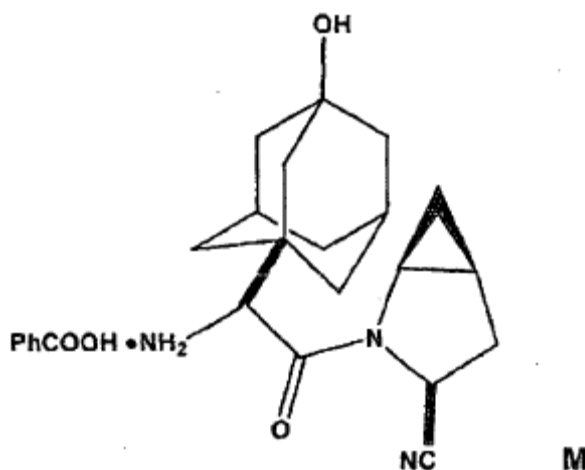
La presente invención proporciona procedimientos y compuestos para su uso en procedimientos de producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Se proporcionan también procedimientos para la aminación reductora asimétrica del compuesto intermedio ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético usado en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Se proporcionan también compuestos intermedios adicionales y los procedimientos para su producción. Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV producidos por los compuestos y procedimientos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones, hiperglucemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidad, y la aterosclerosis y enfermedades relacionadas, así como enfermedades inmunomoduladoras y enfermedad inflamatoria crónica del intestino.

Antecedentes de la invención

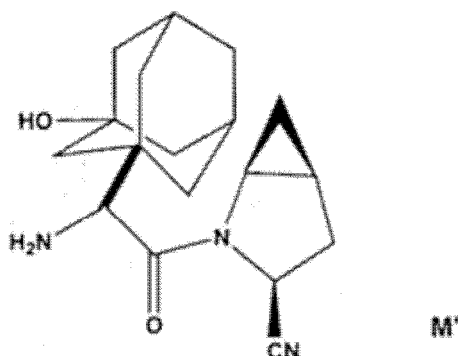
La dipeptidil peptidasa IV es una membrana unida a la serina aminopeptidasa no clásica que se localiza en una variedad de tejidos que incluyen, sin limitación, intestino, hígado, pulmón, y riñón. Esta enzima se localiza también en los linfocitos T en circulación donde se denomina CD-26. Dipeptidil peptidasa IV es responsable de la escisión metabólica de los péptidos endógenos GLP-1 (7-36) y glucagones in vivo y ha demostrado actividad proteolítica frente a otros péptidos tales como GHRH, NPY, GLP-2 y VIP in vitro.

GLP-1 (7-3) es un péptido de 29 aminoácidos derivado del procesamiento posterior a la traducción de proglucagón en el intestino delgado. Este péptido tiene múltiples acciones in vivo. Por ejemplo, GLP-1(7-36) estimula la secreción de insulina e inhibe la secreción de glucagón. Este péptido estimula la saciedad y retrasa el vaciado gástrico. La administración exógena de GLP-1(7-36) mediante infusión continua ha mostrado ser eficaz en pacientes diabéticos. Sin embargo, el péptido exógeno se degrada demasiado rápido para un uso terapéutico continuo.

Se han desarrollado inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV que potencian los niveles endógenos de GLP-1(17-36). La Patente de los Estados Unidos N° 6.395.767 divulga inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Los procedimientos para sintetizar químicamente estos inhibidores se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 6.395.767 así como en la literatura. Por ejemplo, véase Sagnard y col. Tet-Lett. 1995 36:3148-3152; Tverezovsky y col. Tetrahedron 1997 53:14773-14792; y Hanessian y col. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998 8:2123-2128. Un inhibidor preferido divulgado en la Patente de los Estados Unidos N° 6.395.767 es benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, representado en la Fórmula (M).



y su correspondiente base libre, (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (M') y su monohidrato (M'').



base libre M' o su monohidrato

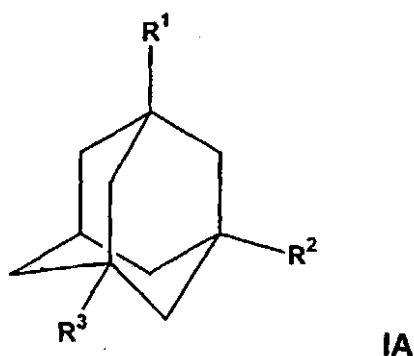
En el documento EP 0 808 824 A2 se divulgan procedimientos adaptados para preparar los intermedios usados en la producción de esta dipeptidil peptidasa IV. Véase también, Imashiro y Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315, Reetz y col. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72, Reetz y Heimbach Chem. Ber. 1983(116):3702-3707, Reetz y col. Chem. Ber. 1983 116:3708-3724.

La presente invención proporciona nuevos procedimientos de producción y compuestos para su uso en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos útiles como intermedios en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo.

Los intermedios descritos en el presente documento comprenden un compuesto de Fórmula IA:



en la que

R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en H y OH:

R² se selecciona entre el grupo que consiste en -C(=O)-COR⁴, -C(=O)NR⁵R⁶, -C(X)_n-COR⁴ y -C-NR⁷R⁸COR⁴, en la que

X es un halógeno;

n es de 1-2

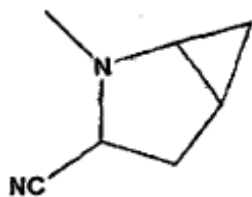
R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en O-alquilo, NH₂ y OH;

cada uno de R⁵, R⁶ y R⁷ y R⁸ se selecciona entre el grupo que consiste en H y COOR⁹, donde R⁹ es un alquilo sustituido o no sustituido; y

y R³ se selecciona del grupo que consiste en H, OH y R¹⁰, en el que R¹⁰ es NHR¹¹C(=O)R¹²,

R¹¹ es R¹³COOH,

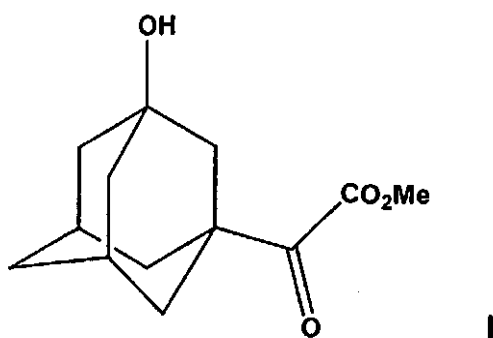
R¹² es



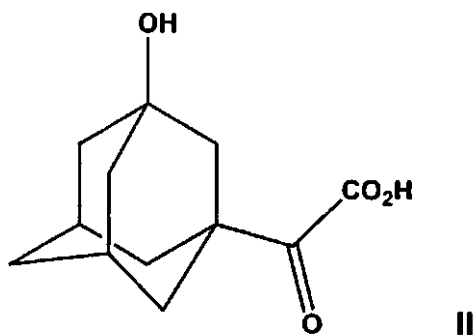
y R^{13} es alquilo o arilo.

Los compuestos preferidos ejemplares de Fórmula IA útiles como intermedios en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo incluyen:

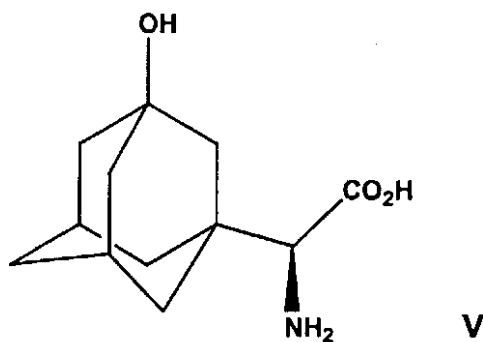
- 5 ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.^{3,7}]decano-1-acético, éster de metilo, representado gráficamente en la Fórmula I,



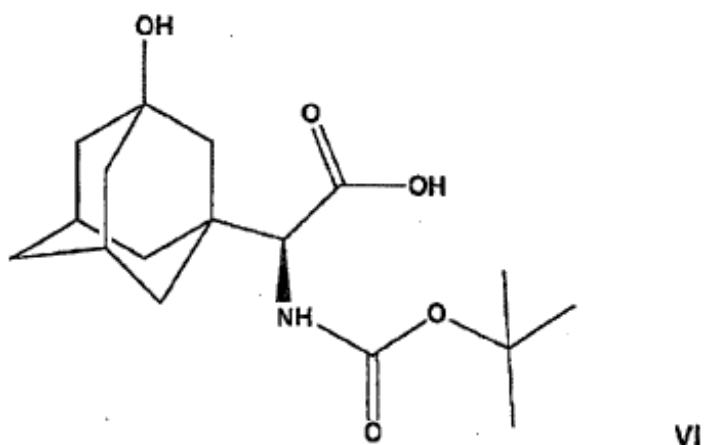
ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la Fórmula II,



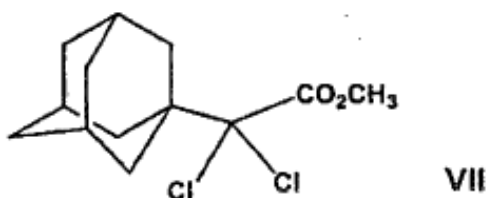
ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la Fórmula V,



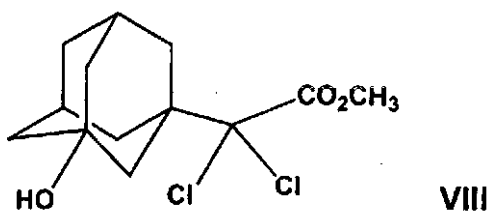
ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiloxi)carbonil]amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado en la fórmula VI,



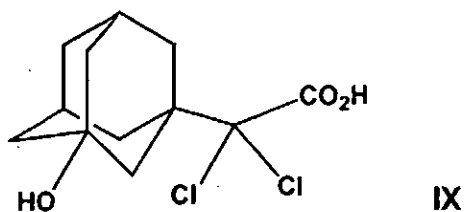
(o su sal VIA de DABCO)
5 éster metílico del ácido adaman-1-il-dicloro acético representado gráficamente en la Formula VII,



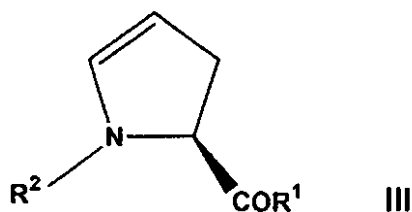
éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético representado gráficamente en la Formula VIII, y



ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético representado gráficamente en la Formula IX



10 Otros intermedios descritos en el presente documento comprenden los compuestos ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil),5-etil éster representado gráficamente en la Fórmula III,

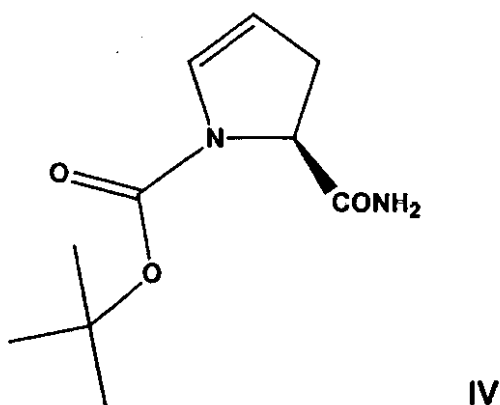


en la que

R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en O-alquilo, NH₂ y OH, y

R² se ha seleccionado del grupo que consiste en t-BOC y CBZ;

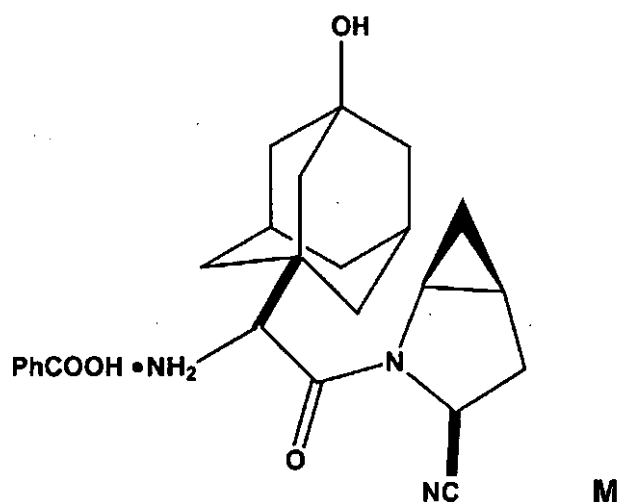
5 y ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster representado gráficamente en la Fórmula IV,



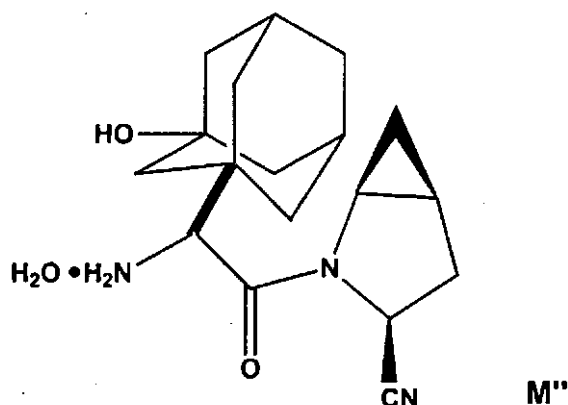
En una realización preferida, estos compuestos se utilizan como intermedios en la producción de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]

10

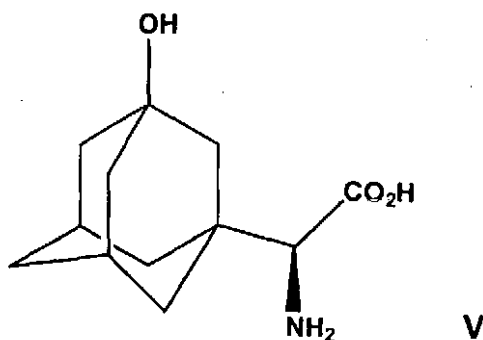
dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0] hexano-3-carbonitrilo, representado gráficamente en la Fórmula M



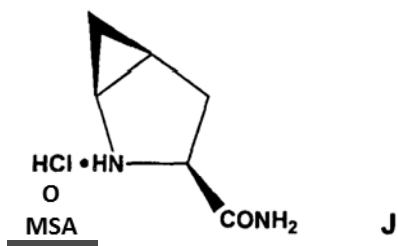
o su base M' libre (definida anteriormente), y su monohidrato M"



Otro objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos para la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. En una realización preferida, los inhibidores producidos son benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxi-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, y su base libre correspondiente representado en las Fórmulas M y M', respectivamente. Estos inhibidores se forman en última instancia a partir del acoplamiento de dos fragmentos, ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la Fórmula V,



y la sal del ácido (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida tal como las sal de clorhidrato o las sal del ácido metanosulfónico (mesilo o sal de MSA) representado gráficamente en la Fórmula J



Se divulgan en el presente documento diversos procedimientos para la producción y el acoplamiento de estos fragmentos dependiendo de los compuestos intermedios seleccionados como materiales de partida. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un inhibidor del ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo representado gráficamente en la Fórmula II. En otra realización de la presente invención se proporciona un procedimiento para la producción del inhibidor del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula V basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Se divulga también un procedimiento para la producción del inhibidor del ácido (<aS)-<a-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula VI basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Se divulga también en el presente documento un procedimiento para la producción del inhibidor de 1-(1,1-dimetiletil) éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico de Fórmula IV basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo.

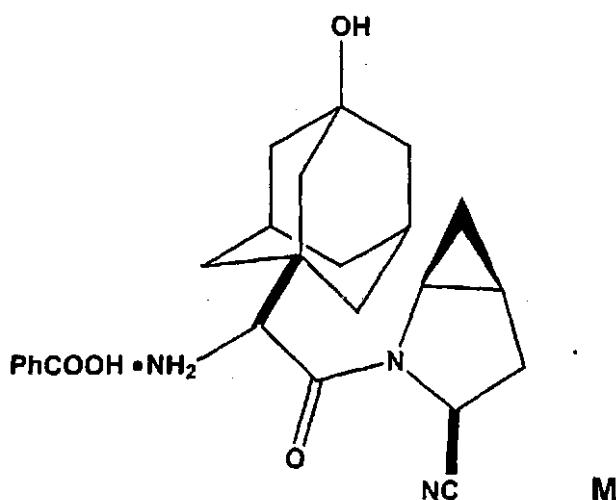
Otro objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos para la síntesis de intermedios útiles en la producción de inhibidores basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. En una realización de la invención, se proporciona un procedimiento para la aminación reductora asimétrica o la transaminación del ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). En otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la síntesis química del ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) a partir del ácido triclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N). También se describen en el presente documento procedimientos para la producción de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a partir del éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII), éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII), y ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX). Se divulgan también procedimientos para la producción del éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII), éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII), y ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX). También se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de 1-(1,1-dimetiletil) éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, (Fórmula IV) 1-(1,1-dimetiletil),5-etil éster del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, (Fórmula III). El 1-(1,1-dimetiletil) éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, (Fórmula (IV) puede usarse a continuación como intermedio en la producción del 1,1-dimetiletil éster del ácido [1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-aminocarbonil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H).

También se describe en el presente documento r una línea celular capaz de producir ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) mediante aminación reductora asimétrica o transaminación del ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). En una realización preferida, la línea celular puede comprender células que contienen un plásmido que expresa la formiato deshidrogenasa y la fenilalanina deshidrogenasa. la más preferida es la línea celular de la ATCC con el Número de Acceso PTA-4520.

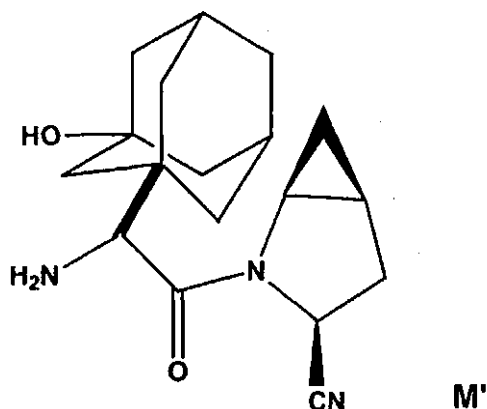
Descripción detallada de la invención

los compuestos basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo tales como benzoato (1:1) (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, y sus bases libres correspondientes y monohidratos de las mismas son inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV útiles en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones, hiperglucemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidad, y la aterosclerosis y enfermedades relacionadas, así como enfermedades inmunomoduladoras y enfermedad inflamatoria crónica del intestino. En la presente invención, se proporcionan nuevos compuestos y procedimientos para uso en la producción de compuestos basados en la pirrolidina fusionada con ciclopropilo tales como benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, y su correspondiente base libre y su monohidrato.

los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV son benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, representado gráficamente en la Fórmula M

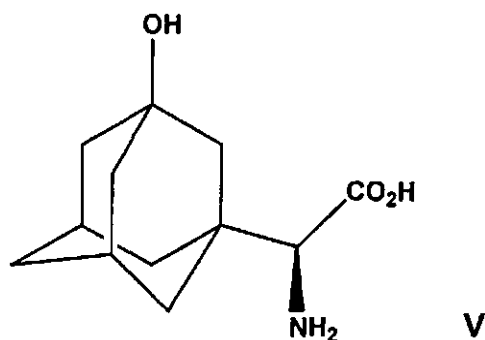


y preferentemente la base libre correspondiente de Fórmula M' representada gráficamente a continuación o su monohidrato M" que se muestra a continuación en el presente documento.

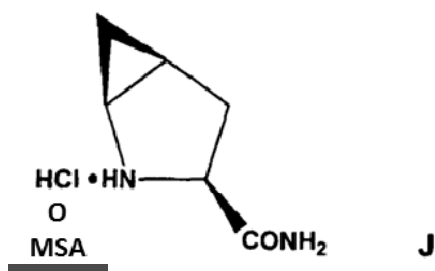


En la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (Fórmula M') mediante el ensamblaje de dos fragmentos. Estos fragmentos son ácido

5 (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la Fórmula V,



y la sales de la (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida tal como la sal de clorhidrato o la sal de MSA) representado gráficamente en la Fórmula J.



10 La presente invención también proporciona procedimientos para la producción de estos fragmentos así como compuestos intermedios útiles en la producción de estos fragmentos.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para la producción del fragmento de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) mediante aminación reductora o transaminación del compuesto intermedio ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). En una realización preferida de este procedimiento, ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) se convierte al ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) mediante aminación reductora llevada a cabo enzimáticamente usando una fenilalanina deshidrogenasa u otras aminoácido deshidrogenasas activas con cetoácidos. Las fenilalanina deshidrogenasas ilustrativas útiles en la presente invención incluyen las derivadas de *Sporosarcina species* o una fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces species* tal como *Thermoactinomyces intermedius*. Se prefiere que la aminación reductora se lleve a cabo con la fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, expresada en *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. construcción y crecimiento de cepas recombinantes de *E. coli* and *Pichia pastoris* que expresan fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, se han descrito por Hanson y col. (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358). El crecimiento de *Pichia pastoris* en metanol induce también la producción de formiato deshidrogenasa (Hanson y col. (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358).

15

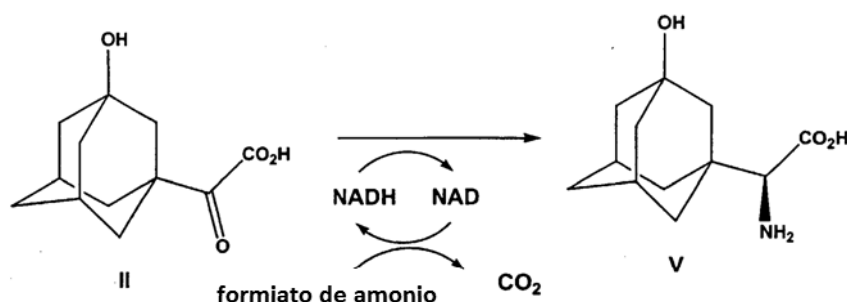
20

25

Células de *E. coli* que contienen un plásmido que expresa la formiato deshidrogenasa de *Pichia pastoris* (ATCC 20864) y una versión modificada de la fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces intermedius* (ATCC 33205) se han depositado y han sido aceptadas por un Organismo Internacional de Depósito según lo estipulado en el Tratado de Budapest. El depósito se ha realizado el 25 de junio de 2002 en la American Type Culture Collection en el 10801 University Boulevard en Manassas, Virginia 20110-2209. El número de acceso de la ATCC es PTA-4520. Todas las restricciones al acceso público de esta línea celular se eliminarán de manera irrevocable tras la concesión de esta solicitud de patente. El Depósito se mantendrá en un depósito público durante un periodo de tiempo de treinta años después de la fecha del depósito o cinco años después de la última solicitud de una muestra o de la vida aplicable de la patente, cualquiera que sea la más larga. La línea celular anteriormente citada era viable en el momento del depósito. El depósito se sustituirá si el depositario no puede dispensar muestras viables.

La aminación reductora del ácido 3-hidroxi-<a>-oxotriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a ácido (<a>S)-<a>-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se representa gráficamente en el siguiente Esquema I.

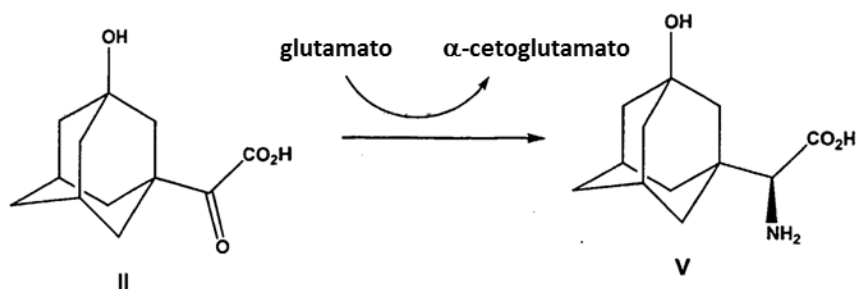
ESQUEMA I



Como se muestra en el Esquema I, esta reacción requiere amoníaco y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) producido durante esta reacción se recicla a NADH mediante la oxidación de formiato a dióxido de carbono mediante la formiato deshidrogenasa. El rendimiento esperado del ácido (<a>S)-<a>-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) procedente de esta reacción es de 80 a 100% y el exceso enantiomérico esperado es mayor del 99%. Véanse también los Ejemplos 1 a 10 en el presente documento.

Se puede llevar a cabo también la misma conversión usando una transaminasa como se muestra en el Esquema II:

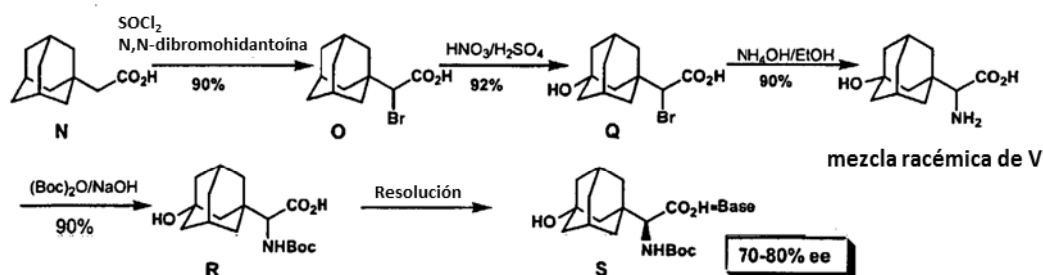
ESQUEMA II



Como se muestra en el Esquema II, en esta conversión enzimática el ácido glutámico sirve como el donante de amino. Una transaminasa ilustrativa para uso en esta conversión es la transaminasa de cadena ramificada que se muestra en el Ejemplo 11 del presente documento.

En otra realización, el ácido (<a>S)-<a>-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se sintetiza químicamente. Un procedimiento ilustrativo para la síntesis química del ácido (<a>S)-<a>-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se representa gráficamente en el Esquema III:

ESQUEMA III



Como se muestra en el Esquema III, una mezcla racémica del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se sintetiza químicamente químicamente a partir del ácido triciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) bromando en primer lugar el ácido triciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético en el ácido α-bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O). En esta bromación, el material de partida, ácido triciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) se suspende en cloruro de tionilo. Se añadió a continuación dimetil formamida (DMF) y se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La finalización de la reacción se verificó mediante cromatografía de gases. Se añadió a continuación anhídrido N-bromosuccínico sólido (NBS) por partes a la mezcla de reacción y se calentó la mezcla de reacción a 60° C. La temperatura se mantuvo entre 60 y 65°C a la vez que se agitó la reacción durante 3 horas. De nuevo, La finalización de la reacción se verificó mediante cromatografía de gases. A continuación se añadió heptano a la mezcla de reacción y se eliminó mediante destilación el exceso de cloruro de tionilo a 78-80°C. Se añadió agua para detener rápidamente la reacción y se añadió heptano adicional. A continuación se separó la capa acuosa de la capa orgánica y se lavó la capa orgánica con agua. Tras lavar, se añadió agua adicional a la capa de heptano y el heptano se eliminó mediante destilación. A continuación se añadió tetrahydrofurano (THF) a la capa acuosa restante y la mezcla se agitó intensamente a temperatura ambiente durante múltiples horas. Se puede añadir agua adicional para acelerar esta hidrólisis. A continuación, el THF se eliminó mediante destilación, dejando una mezcla de reacción bifásica (agua y aceite). Se añadieron a continuación semillas y se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente a la vez que se producía ácido α-bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) como un sólido pesado. Se añadieron agua y acetonitrilo para mantener la suspensión agitable. Tras agitar durante algunas horas, el sólido que contiene el ácido α-bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) se eliminó mediante filtración y se lavó varias veces con acetonitrilo. Véase también el Ejemplo 17 en el presente documento.

A continuación se hizo reaccionar ácido α-Bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) con H₂SO₄ y HNO₃ para producir ácido α-bromo-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q). Más específicamente, se preparó ácido α-bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) a partir de un α-bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) cargando en primer lugar un matraz Erlenmeyer con H₂SO₄. A continuación se enfrió el matraz en un baño de hielo y se añadió HNO₃ al 50% al matraz. A continuación se añadió el α-bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) sólido a la mezcla por partes manteniendo la temperatura por debajo de 28°C. A continuación se calentó la reacción a 60°C con agitación hasta que se obtuvo una disolución transparente. Cuando se completó la reacción, se enfrió y se mantuvo a temperatura ambiente. A continuación se añadió agua para inactivar rápidamente la reacción. La suspensión resultante se enfrió en un baño de hielo y se filtró a continuación para obtener ácido α-bromo-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q). Véase también el Ejemplo 18 en el presente documento.

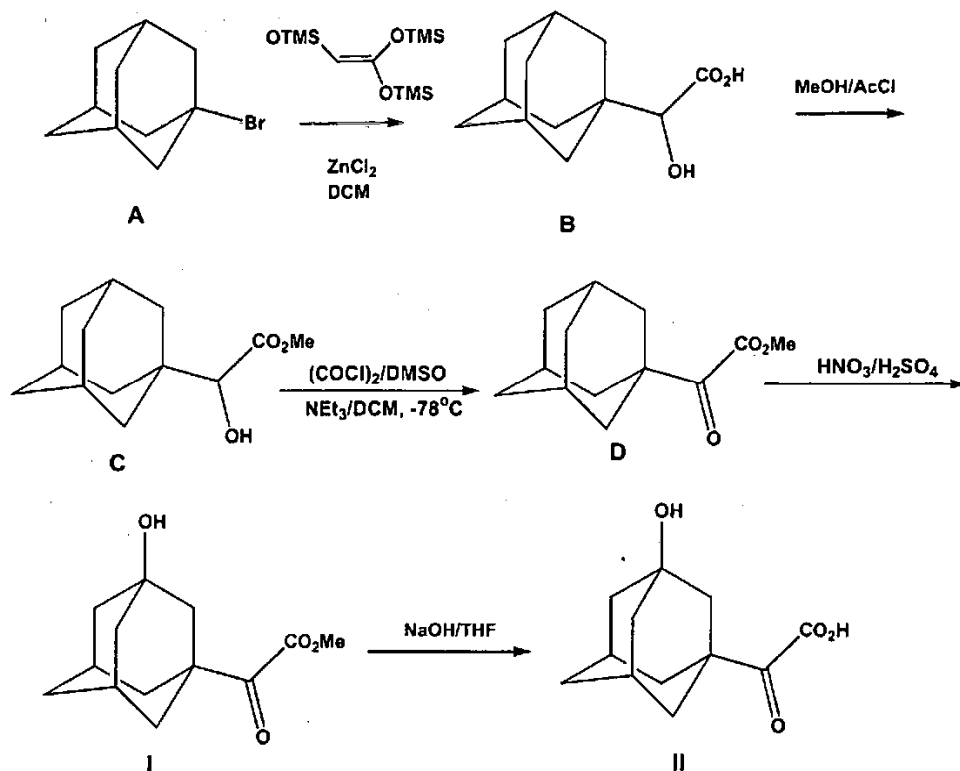
A continuación se disolvió ácido α-Bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) en hidróxido amónico, preferentemente hidróxido amónico al 30% y la mezcla de reacción se calentó preferentemente a 65°C. A continuación, la mezcla de reacción se concentró hasta un sólido. A continuación se añadió EtOH y la reacción se concentró de nuevo para dar como resultado una mezcla racémica que comprende ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). Véase también el Ejemplo 19 en el presente documento.

Para aislar (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (mezcla racémica de Fórmula V) de la mezcla racémica, la mezcla se trató mediante protección típica de Boc usando anhídrido de Boc e hidróxido de sodio en tetrahydrofurano para dar como resultado ácido α-[[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-[3]hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto R). Se mezcló a continuación ácido α-[[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-[3]hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto R) con una base quirral tal como [1R,2S]-(-)-1,2-difenilhidroxi etilamina, 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptano-2-amina, o S-(-)-1-1(1-naftil)etilamina y la mezcla se evaporó hasta sequedad. La mezcla seca se volvió a suspender en un disolvente y la mezcla resuspendida se colocó en un agitador con calentamiento durante algunas horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, se produce la cristalización del ácido (αS)-α-[[[dimetiletoxi]carbonil] amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto S). Véase también el Ejemplo 20 en el presente documento.

La eliminación del grupo Boc da como resultado el ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V).

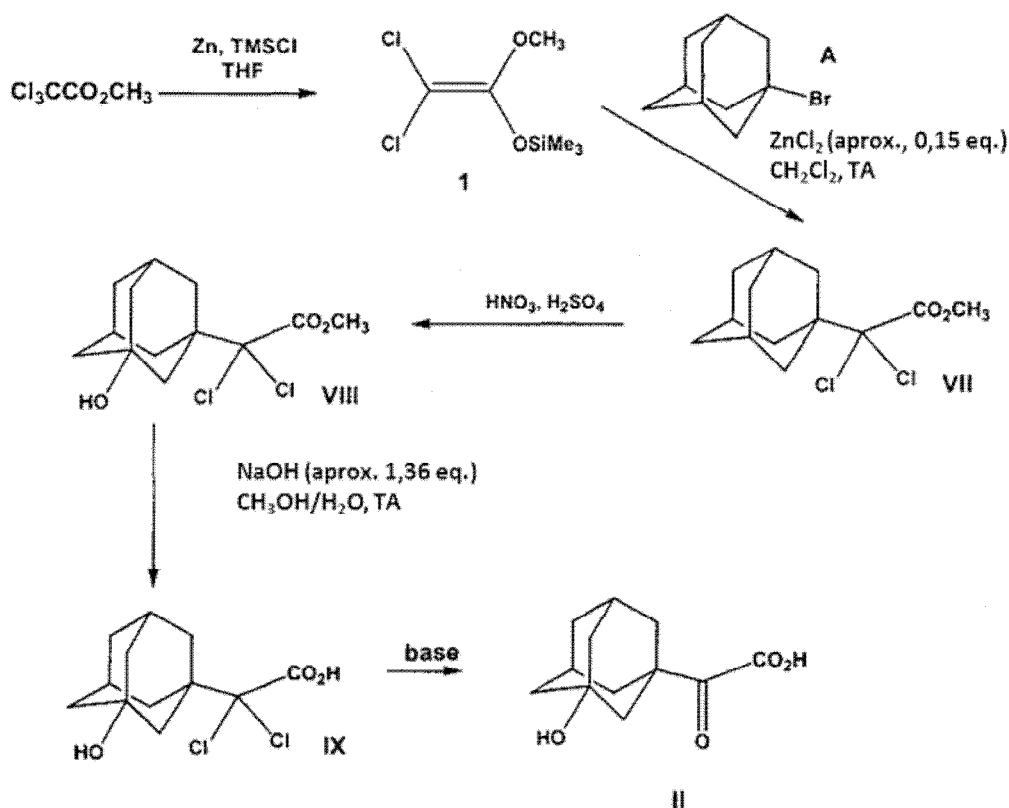
También se divulga en el presente documento procedimientos para la producción del compuesto intermedio ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) usado en la síntesis del fragmento del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). el compuesto intermedio ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) se puede producir de acuerdo con el procedimiento representado gráficamente en el Esquema IV.

ESQUEMA IV



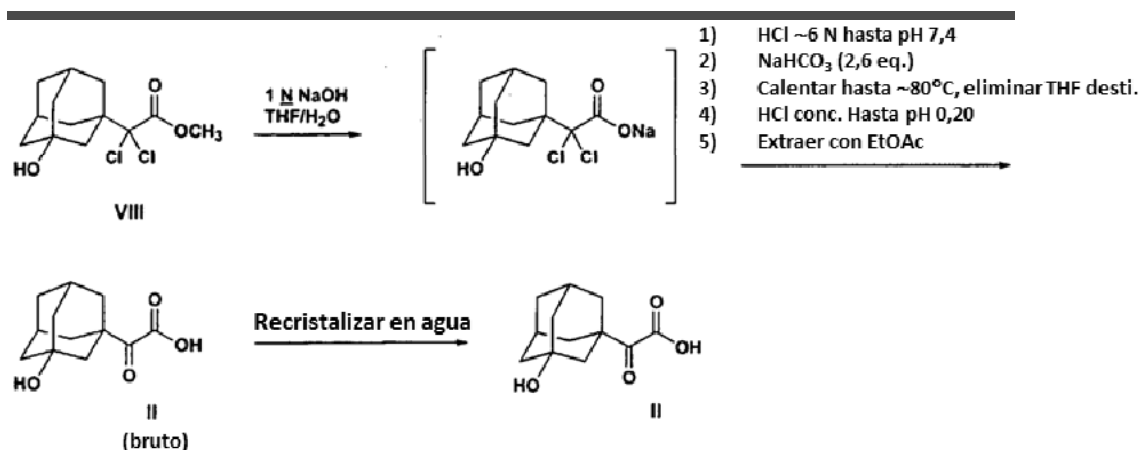
- 10 Como se muestra en el esquema IV, en este procedimiento, el bromuro de adamantilo (Fórmula A) se alquila mediante catálisis del cloruro de cinc para producir ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B). a continuación se esterifica el ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) utilizando cloruro de acetilo en metanol para producir el éster metílico del ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula C).
- 15 El éster metílico del ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula C) se convierte a continuación a éster metílico del ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula D) mediante oxidación de Swern. A continuación se hidroxiló el éster metílico del ácido <a-Oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula D) para formar el éster metílico del ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula I), que se hidrolizó a continuación para formar el ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). Véanse también los Ejemplos 21 a 25 en el presente documento.
- 20 Alternativamente, el compuesto intermedio ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) se puede producir de acuerdo con el procedimiento representado gráficamente en el Esquema V.

ESQUEMA V



Como se muestra en el esquema V, (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano 1 se preparó mediante modificación poco importante del procedimiento de Kuroda y col. (documento EP 08 824A3; Imashiro y Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315). El tratamiento de bromoadamantano con I bajo la influencia de cloruro de cinc (Reetz y col. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72; Reetz y Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707; Reetz y col. Chem. Ber. 1983 116:3708-3724) da como resultado el éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético de Fórmula VII. A continuación se hidroxiló el éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético de Fórmula VII con óxido nítrico en ácido sulfúrico concentrado para proporcionar rendimiento cuantitativo del éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula VIII. La hidrólisis de Fórmula VIII con disolución acuosa de hidróxido de sodio en metanol a temperatura ambiente da como resultado el ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula IX. El tratamiento posterior del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX) con una base débil, preferentemente bicarbonato de sodio, a temperatura elevada da como resultado la formación exclusiva del compuesto intermedio ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético. Véanse también los Ejemplos 26 a 29.

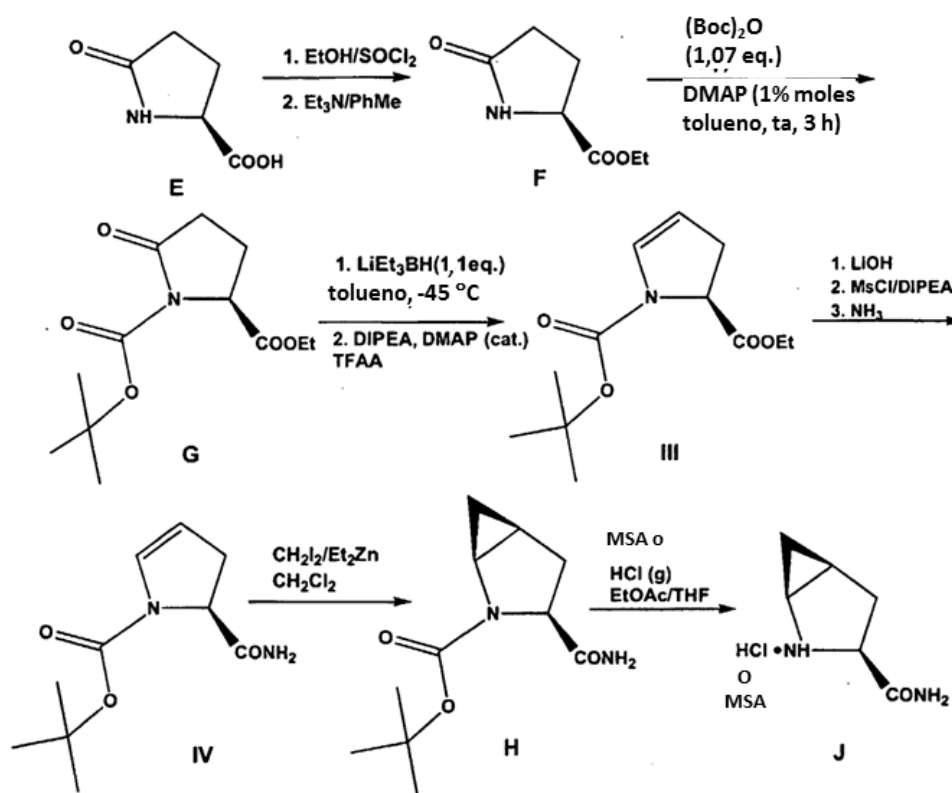
ESQUEMA VA



Como se muestra en el esquema VA se puede preparar el compuesto intermedio 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) en un procedimiento en un único recipiente. Como se observa, el tratamiento del compuesto de Fórmula VIII con una disolución acuosa de hidróxido de sodio en tetrahidrofurano (u otra base tal como hidróxido de potasio o hidróxido de litio) en una atmósfera inerte tal como argón, da como resultado la correspondiente sal de sodio. Sin recuperar la sal de sodio, la mezcla de reacción que contiene la sal de sodio se trata con un ácido tal como ácido clorhídrico a un pH más bajo de menos de aproximadamente 0,50, preferentemente aproximadamente 0,20, para formar el correspondiente cetoácido II, que se puede recrystalizar a partir de agua para formar cristales del cetoácido II.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción del fragmento (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J). Este fragmento usado en la producción de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo se puede producir de acuerdo con el procedimiento representado gráficamente en el Esquema VI que se muestra a continuación.

ESQUEMA VI



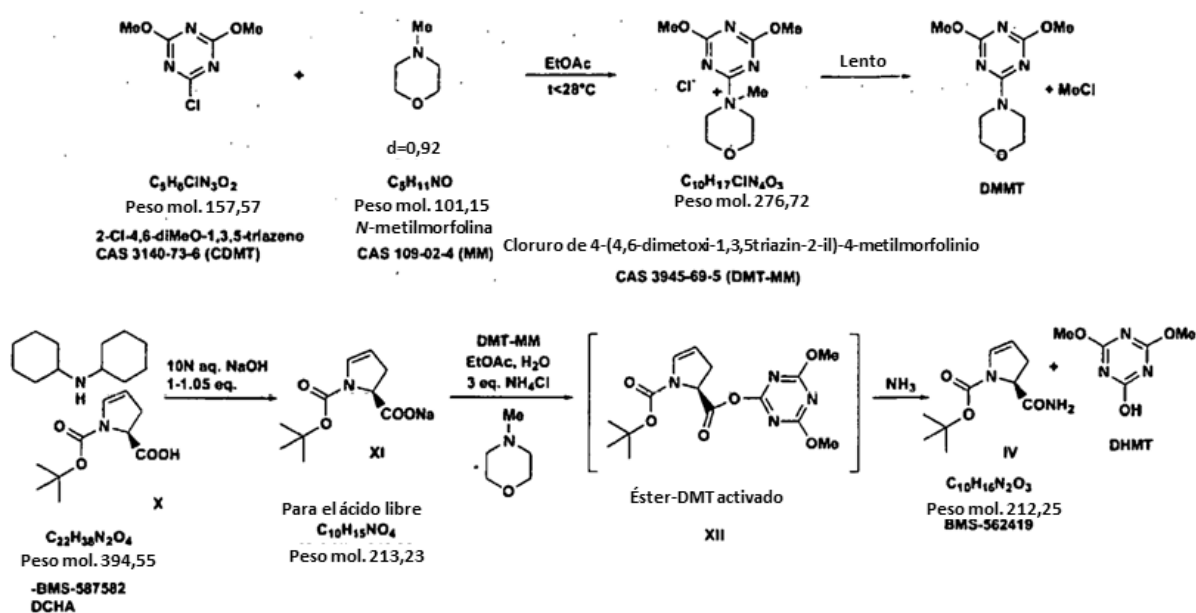
Como se muestra en el Esquema VI, el ácido L-pirolglutámico (Fórmula E) se esterificó en primer lugar para producir el etil éster del ácido L-pirolglutámico (Fórmula F; SQ 7539). Este etil éster del ácido L-pirolglutámico se protege a continuación con BOC en el nitrógeno para producir ácido el 1-(1,1-dimetiletil)-5-etil éster (5S)-2-oxopirrolidina-1,5-dicarboxílico, (Fórmula G). A continuación se llevó a cabo la reducción y eliminación del superhidruro para formar el 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil)-5-etil éster (Fórmula III). El BOC-DHPEE III se hidrolizó a continuación mediante saponificación con hidróxido de litio para formar BOC-DHP. A continuación se formó una amida en BOC-DHP mediante un anhídrido mixto usando cloruro de mesilo seguido por amoníaco para producir el ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1 -dimetiletil) éster (Fórmula IV). El ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster (Formula IV) se trató con ciclopropano a continuación mediante la reacción de Simmons-Smith para producir el ácido [1S-1,1-(1<a,3<b,5<a]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico,(Fórmula (IV), 1,1-dimetiletil éster (Fórmula H). A continuación se eliminó BOC dando como resultado la formación una sal de ácido tal como la sal de clorhidrato o la sal del ácido metanosulfónico del fragmento (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J). Véanse también los Ejemplos 29 al Ejemplo 35.

Se divulga también en el presente documento y se representa gráficamente en el Esquema VI la transformación del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico 1-(1,1 -dimetiletil) éster (Formula IV) a ácido [1S-1,1-(1<a,3<b,5<a]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, dimetiletil éster (Fórmula H) mediante ciclopropanación en una reacción de Simmons-Smith. En esta reacción, el ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster se disolvió en cloruro de metileno en

un primer reactor. En un segundo reactor, se enfrió cloruro de metileno a -30°C y se añadieron dimetoxi etano y una disolución al 30% de dietil cinc en tolueno seguido por la adición de diyodo metano. A continuación se añadió esta mezcla al primer reactor seguido por la adición de disolución de bicarbonato saturado. La mezcla de reacción resultante se agitó hasta que se formó un precipitado. A continuación se filtró el precipitado, se lavó y se volvió a suspender en cloruro de metileno dos o más veces. A continuación se separaron los filtrados en sus fases acuosa y orgánica y se lavó la fase orgánica con salmuera semisaturada. Se eliminó el disolvente y se intercambió por heptano para obtener una suspensión de producto bruto de ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, 1,1-dimetil éster (Formula H) en heptano

Alternativamente, el ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetil etil) éster (Fórmula IV) se puede preparar tal como se muestra en el Esquema VIA.

ESQUEMA VIA



Como se muestra en el esquema VIA la sal DCHA del 1-(1,1-dimetil)éster del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico X se trató con una base de metal alcalino tal como hidróxido de sodio para formar la correspondiente sal, tal como la sal de sodio.

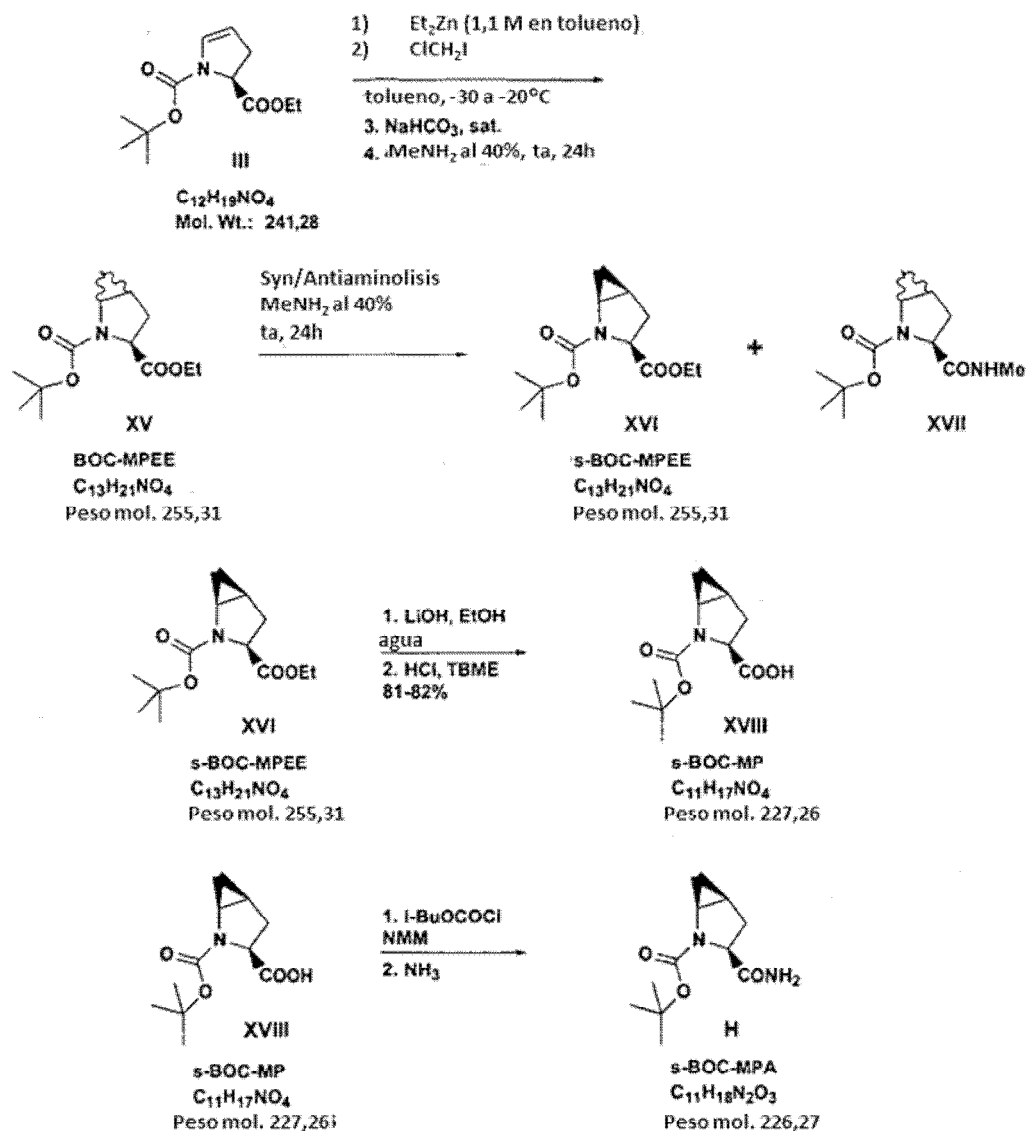
La sal de sodio del 1-(1,1-dimetil)éster del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico XI se puede preparar también a partir del correspondiente éster etílico tratando el éster etílico (preferentemente una disolución del éster etílico en tolueno) con etanol e hidróxido de sodio.

Se trató una disolución de la sal de sodio XI con tampón tal como cloruro de amonio y dihidrogenofosfato de sodio para disminuir el pH de la disolución por debajo de 7, preferentemente aproximadamente 6 a 6,5, y la disolución tamponada y la sal de sodio se trataron con cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM) para formar el éster de DMT activado XII que se trató con amoníaco u otra base como sulfato de amonio, cloruro de amonio o hidróxido de amonio, para formar el 1-(1,1-dimetiletil)éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico IV.

Se puede preparar el cloruro 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DTM-MM) tal como se muestra en el Esquema VIA haciendo reaccionar 2-Cl-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) y N-metilmorfolina a temperaturas reducidas que varían de aproximadamente 0 a aproximadamente 10°C para formar DMT-MM.

La sal DCHA del 1-(1,1-dimetil)éster del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico X se puede preparar a partir de la correspondiente sal de sodio XI tratando una disolución acuosa de sal de DCHA X anteriormente preparada con metil t-butil éter (MTBE) ajustando el pH de la mezcla de reacción a 2,5-3 empleando un ácido tal como H_3PO_4 . La capa orgánica se separó y se trató con salmuera para formar la correspondiente sal de sodio XI. La mezcla de reacción resultante se enfrió y se trató con DCHA para formar la correspondiente sal de DCHA X.

ESQUEMA VIB



Se puede preparar también el compuesto H del Esquema VI tal como se muestra en el Esquema VIB mediante ciclopropanación del éster etílico de N-BOC-deshidroprolina III como sigue.

- 5 Etíl éster de N-BOC 4,5-deshidroprolina III se trató con dietil cinc y cloro yodometano en presencia de un disolvente orgánico seco tal como tolueno, cloruro de metileno o dicloroetano a una temperatura reducida que varía entre aproximadamente -30 y aproximadamente 0°C para formar el etíl éster de N-BOC 4,5-metanoprolina XV.

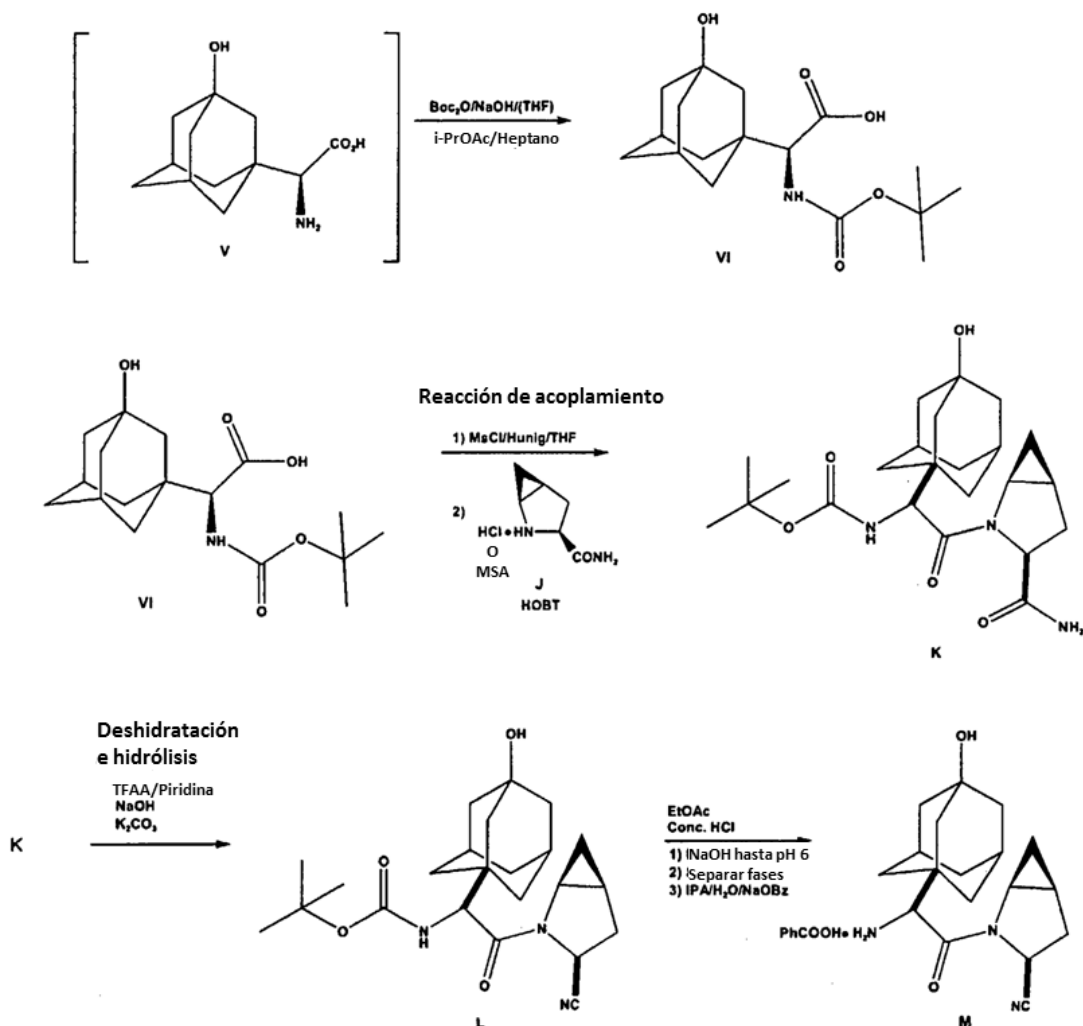
- 10 El éster etílico de BOC 4,5-metanoprolina XV (mezcla de sin-y anti-isómeros (8:1)) se separó tratando con metil amina acuosa bajo una atmósfera inerte tal como una atmósfera de nitrógeno y se recuperó del éster etílico de sin (S)-BOC-4,5-metanoprolina XVI (separado a partir de XVII).

El éster etílico de BOC-4,5-metanoprolina XVI en etanol u otros disolventes orgánicos tales como tolueno o THF se trata con base, tal como hidróxido de litio acuoso, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio para formar el correspondiente ácido de la s-BOC-metanoprolina libre XVIII.

- 15 El ácido libre XVIII se convierte a correspondiente amida H de s-BOC-metanoprolina tratando el ácido libre XVIII en un disolvente orgánico tal como THF o cloruro de metileno; cloroformiato de isobutilo o cloruro de mesilo, en presencia de N-metil morfolina, a temperaturas reducidas de tal manera que no exceda de -8°C, y a continuación tratando la mezcla de reacción con amoníaco para formar la amida H de la s-BOC-metanoprolina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para acoplar los fragmentos del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) y (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) para producir el (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, benzoato (1:1). En el Esquema VII siguiente se representa gráficamente el acoplamiento de estos fármacos.

ESQUEMA VII



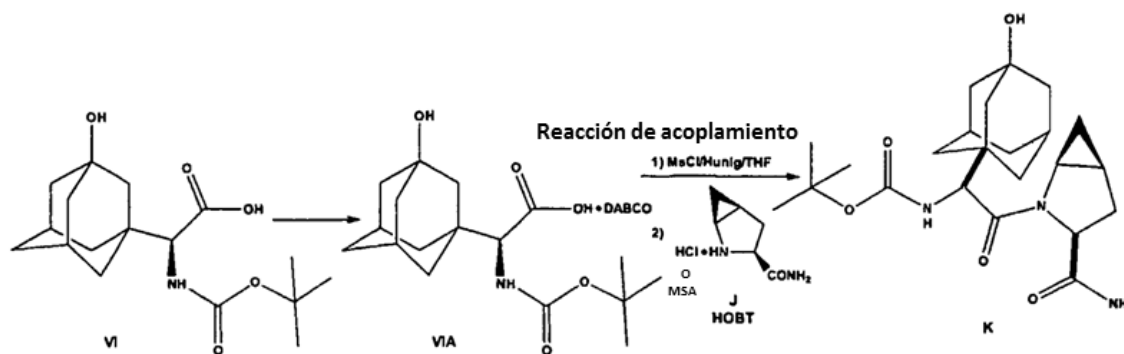
Como se muestra en el esquema VII, el fragmento del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se protege en primer lugar con BOC para producir el ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) tratando V con Boc_2O en presencia de una base tal como hidróxido de sodio y se separó mediante la extracción de acetato de etilo (EtOAc) para separar ácido libre exento VI. Alternativamente, en lugar de acetato de etilo, se puede emplear acetato de isopropilo/heptano para cristalizar el ácido libre VI. En otra realización, el compuesto de Fórmula V se utiliza sin aislamiento a partir de una bioconversión utilizando un concentrado de enzima PDH/FDH aislado que se muestra en el Ejemplo 8A.

Se trató una disolución del compuesto de Fórmula VI en un disolvente orgánico adecuado tal como tetrahidrofurano (THF) (enfriarse a una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente -10 y aproximadamente 0°C) con cloruro de metanosulfonilo (Cl de mesilo) y base de Hunig (diisopropiletilamina o DIPEA) para formar la correspondiente sal del ácido metanosulfónico de VI.

A continuación se usó una reacción de acoplamiento para acoplar ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) sal de ácido metanosulfónico a (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) u otro agente de acoplamiento conocido para producir el 1,1-dimetil éster del ácido 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanoc arbámico, (Formula K). El compuesto de Fórmula K se sometió a deshidratación tratando el compuesto K con una base orgánica tal como piridina o trietilamina y anhídrido trifluoroacético, y a continuación sometiendo la

la reacción a hidrólisis enfriando a entre aproximadamente 0 a aproximadamente 10°C y añadiendo hidróxido de sodio u otra base fuerte tal como KOH o LiOH para formar el Compuesto L. ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-ethanocarbámico o, 1,2-dimetiletil éster (Formula L), que se desprotege a continuación (y se trata con benzoato de sodio) para formar el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, benzoato (1:1) (Fórmula M) Véanse también los Ejemplos 37 a 39 en el presente documento.

ESQUEMA VIIA

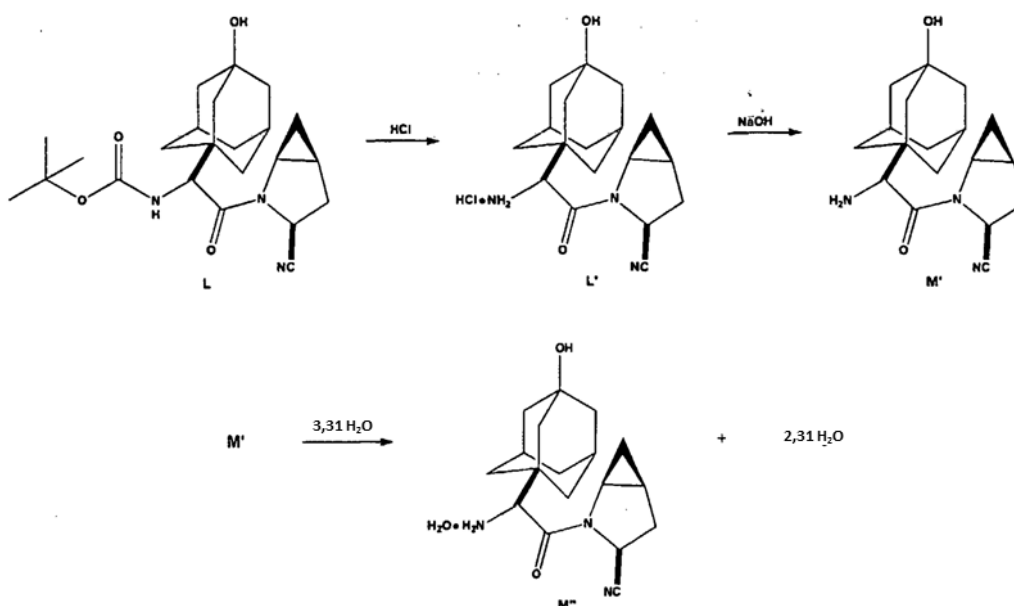


Como se muestra en el esquema VIIA, se puede preparar también el compuesto K a partir del compuesto VIA (sal DABCO) como sigue.

Se trata el ácido de Fórmula VI con 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) para formar la sal de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano de ácido (α S)- α [(1,1-dimetil-etoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VIA). A continuación se usó una reacción de acoplamiento para acoplar la sal de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano del ácido (α S)- α [(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VIA) HCl de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida o MSA (Fórmula J) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) u otro agente de acoplamiento conocido para producir el 1,1-dimetil éster del ácido 3-(aminocarbonil)- α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Formula K).

Con referencia ahora al Esquema VII, se puede desproteger el compuesto L mediante tratamiento con un ácido fuerte tal como ácido clorhídrico como se describe con respecto al Esquema VIIIB.

ESQUEMA VIIIB



Con referencia al Esquema VIIIB, se puede formar la base libre del monohidrato M'' a partir del intermedio L protegido con BOC como sigue.

El intermedio L protegido con BOC se trató con ácido clorhídrico concentrado en presencia de cloruro de metileno y

metanol manteniendo a la vez la temperatura de reacción comprendida en el intervalo de aproximadamente 20 y 25°C para formar la sal de clorhidrato L'. La sal de clorhidrato L' se trató con ácido clorhídrico y, a continuación, con hidróxido de sodio u otra base fuerte para formar la base libre M'. La base libre M' se trató con agua para formar el monohidrato de base libre M".

- 5 Como entenderán los expertos en la materia tras leer esta divulgación, el producto final, el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, (Fórmula M) o su base libre correspondiente M' o monohidrato M" de la misma puede producirse usando todas las etapas representadas gráficamente en los esquemas I, II, o III y IV, V, VI, VII y VIIA o solo una porción de las etapas representadas gráficamente en cualquiera de los Esquemas I, II, o III y IV, V, VI, VII y VIIA dependiendo de cuál intermedio se selecciona como material de partida. Por ejemplo, usando las técnicas de
- 10 la presente invención, un experto en la materia puede producir de forma rutinaria el inhibidor basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, (Fórmula M) o la base libre correspondiente M' usando el ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula II, el ácido
- 15 (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula V, la sal del 1,4-dizabicyclo[2.2.2]octano del ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula VIA, o el 1-(1,1-dimetiletil) éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, de Fórmula IV como el material de partida.

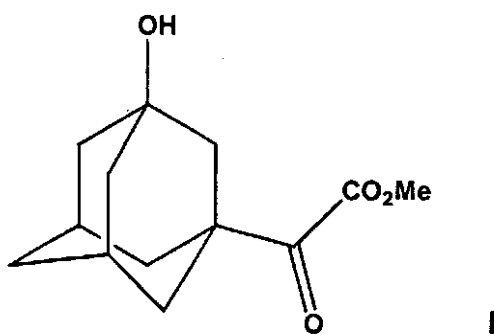
- Por tanto, un experto en la materia puede producir un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV basado en pirrolidina fusionado con ciclopropilo sencillamente por acoplamiento del ácido
- 20 (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VI) (o su sal DABCO (Fórmula VIA)) a (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) para producir el ácido 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula K); deshidratando el 1,1-dimetiletil éster del ácido
- 25 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula K) para producir el 1,1-dimetiletil éster del ácido 3-ciano-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula L). e hidrolizando el 1,1-dimetiletil éster del ácido
- 30 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula L) para formar el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV En este procedimiento, los materiales de partida comprenden los fragmentos, del ácido
- 35 (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) (o su sal DABCO (Fórmula VIA)) y la (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J).

- Sin embargo, el procedimiento puede comprender además etapas para la producción del fragmento del ácido
- 35 (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) a partir del intermedio ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) mediante la protección de BOC. En esta realización, el procedimiento puede comprender además la producción del intermedio del ácido
- 40 (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético reduciendo asimétricamente el ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) mediante la aminación o la transaminación enzimática (véase el Esquema I o II). Alternativamente, el procedimiento puede comprender además la síntesis química del ácido
- 45 (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (fórmula V) a partir del ácido tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) de acuerdo con el Esquema III

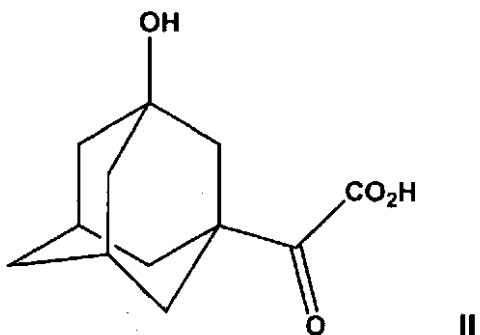
- Además, o alternativamente, el procedimiento puede comprender además etapas para la producción del fragmento (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) mediante la eliminación de BOC a partir del
- 45 intermedio del 1,1-dimetil éster del ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula H). En esta realización, el procedimiento puede comprender además una etapa para la producción del 1,1-dimetil éster del ácido (1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H) mediante ciclopropanación, preferentemente mediante una reacción de Simmons-Smith del 1-(1,1-dimetil) éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico (Fórmula IV).

- 50 También se divulgan en el presente documento compuestos nuevos que se identifican en el presente documento como intermedios útiles en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Los compuestos útiles como intermedios en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV basados en pirrolidina fusionada con ciclopropilo incluyen:

Éster metílico del ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, representado gráficamente en la Fórmula I,

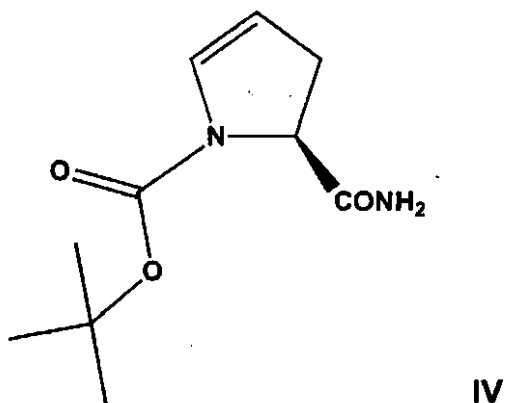


ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la Fórmula II,

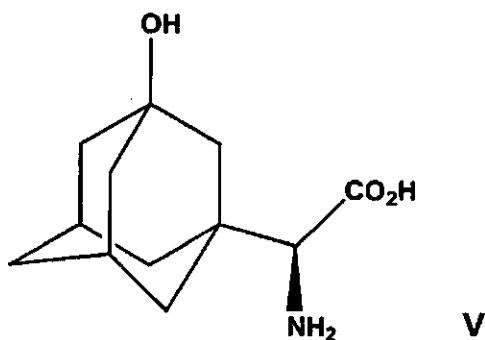


5

el éster 1-(1,1-dimetiletilico) del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, éster representado gráficamente en la Fórmula IV,



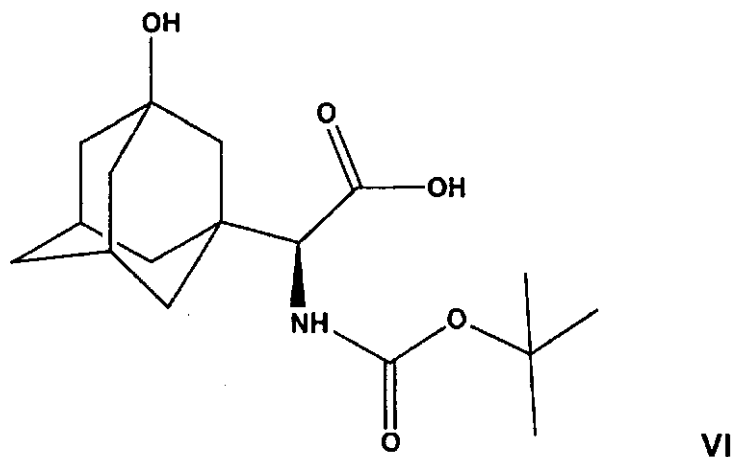
ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la Fórmula V,



10

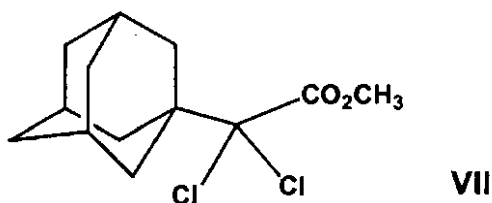
del ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético representado gráficamente en la

Fórmula VI,

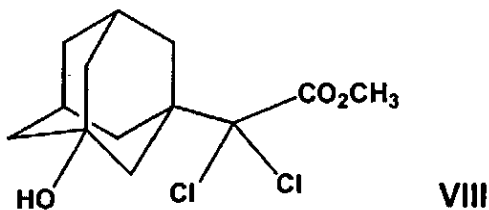


5 (o su sal DABCO VIA)

éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético representado gráficamente en la Formula VII,

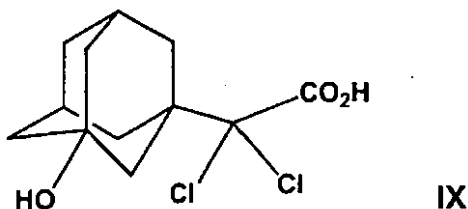


éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético representado gráficamente en la Formula VIII, y

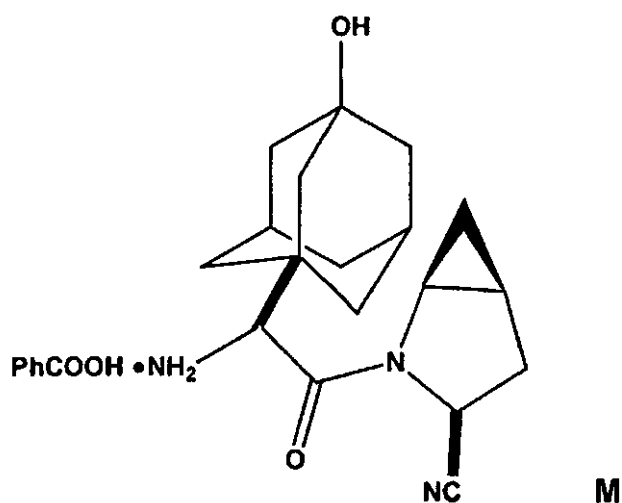


10

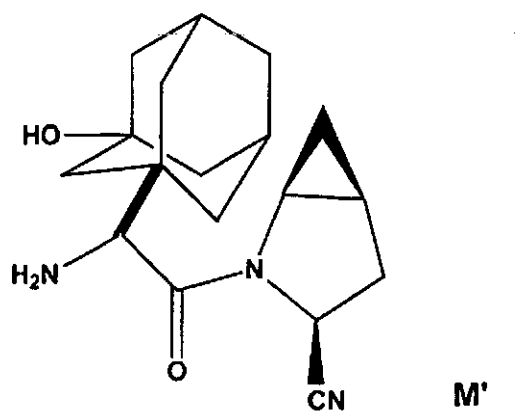
ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético representado gráficamente en la Formula IX



15 Como se muestra en el presente documento, estos compuestos se utilizan como intermedios en la producción de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, representado gráficamente en la Fórmula M



y preferentemente la base libre correspondiente o su monohidrato representado gráficamente en las Fórmulas M' y M'', respectivamente,



5 o su monohidrato M'' (que se ha mostrado antes en el presente documento).

La inhibición de la dipeptidil peptidasa IV producida por los compuestos y procedimientos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones, hiperglucemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidad, y aterosclerosis así como en las enfermedades relacionadas así como en enfermedades inmunomoduladoras y enfermedad crónica inflamatoria del intestino.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Aminación reductora usando un extracto de *Pichia pastoris* recombinante que expresa fenilalanina deshidrogenasa procedente de *Thermoactinomyces intermedius* y produciendo una formiato deshidrogenasa endógena

15 Se añadieron células congeladas de *Pichia pastoris* recombinante (2,25 kg) que expresaban la fenilalanina deshidrogenasa procedente de *Thermoactinomyces intermedius* a agua desionizada (6,75l) que contenía formiato de amonio (28,65 g, 0,454 moles). Tras descongelar, se suspendieron las células con un homogeneizador Janke and Kunkel Ultra-turrax T25, se ajustaron a pH 7 con NH₄OH concentrado y se enfriaron con hielo picado para dar una suspensión celular al 25% en p/v en formiato de amonio 50 mM. Las células se rompieron mediante 2 pases a través
20 de un microfluidizador a 12000 psi (81,6 MPa) y se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación del sobrenadante a 20.000xg y 4°C. Se añadió sobrenadante, 7024 ml, que contenían 230998 unidades o 124641 unidades de actividad de la fenilalanina deshidrogenasa determinada de acuerdo con el Ensayo A (véase el Ejemplo 9) o el Ensayo B (véase el Ejemplo 10), respectivamente, y se añadieron 80080 unidades de formiato deshidrogenasa a un recipiente de 16 l de un biorreactor New Brunswick Scientific Bioflo IV.

25 Se preparó una disolución de 7024 ml que contenía formiato de amonio (442,5 gramos, 7,017 moles) y ácido (3-hidroxiadamantan-1-il)-oxo-acético (786,7 gramos, 3,510 moles). Se ajustó el pH de esta disolución a 8,0 con 276 ml de hidróxido de amonio concentrado. A continuación se añadieron nicotinamida adenina dinucleótido (NAD; 9,834

gramos 14,82 mmoles) y ditioneitol (2,163 gramos, 14,027 mmoles) y se añadió la disolución al biorreactor que contenía el extracto de *Pichia pastoris*. La disolución se mantuvo a 40°C y se agitó a 150 rpm. Se añadieron alícuotas de hidróxido de amonio concentrado de 45, 25 y 27 ml a 0, 3 y 18 horas, respectivamente, tras el inicio de la reacción para ajustar el pH a 8,0. Tras 25 horas, la disolución contenía 818,9 gramos (3,637 moles, rendimiento del 100%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético tal como se midió mediante el análisis de HPLC (véase el Ejemplo 8, Procedimiento 2) y el cetóácido o el enantiómero R del aminoácido no fue detectable.

Se aisló el ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético mediante un procedimiento que consistía en someter a ebullición la mezcla de transformación enzimática para eliminar el amoníaco, ajustar a pH 3 con ácido fórmico, filtración para eliminar las proteínas precipitadas, sorción del aminoácido en resina Dowex 50 (H+) elución con amoníaco 1,5 M y concentración del efluente rico para dar ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como un sólido cristalino. El último ciclo con este procedimiento de aislamiento (una entrada de 787 gramos de cetóácido) proporcionó 804 gramos de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético con una potencia de 94,3% y un rendimiento de 96,0% a partir de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético. Todos los lotes de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético aislados mediante este procedimiento se comportaron bien en las reacciones posteriores para obtener el benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, benzoato.

Ejemplo 2

Aminación reductora usando células secadas térmicamente de *Pichia pastoris* recombinante

Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 4,0 ml a pH 8,0 (pH ajustado con NH₄OH): formiato de amonio 0,50 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,25 M, NAD 1,06 mM, ditioneitol 1,00 mM, y 250 mg de células de *Pichia pastoris* secadas térmicamente que contenían 32,7 unidades de fenilalanina deshidrogenasa determinada de acuerdo con el Ensayo A, y 24,6 unidades de formiato deshidrogenasa. Hanson y col. han descrito la preparación de células de *Pichia pastoris* secadas térmicamente (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358). La disolución se incubó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml a 40°C, 100 rpm durante 4 días, a continuación se analizó mediante HPLC La disolución contenía 45,02 mg/ml (rendimiento del 80%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

Ejemplo 3

Aminación reductora usando células húmedas de *Pichia pastoris* recombinante

Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 3,0 ml a pH 8,0 (pH ajustado con NH₄OH): formiato de amonio 0,415 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,208 M, NAD 0,88 mM, ditioneitol 0,84 mM, y 12,5% % p/v de células de *Pichia pastoris* que contenían 6,06 unidades de fenilalanina deshidrogenasa determinada de acuerdo con el Ensayo A, y 12,8 unidades de formiato deshidrogenasa. La disolución se incubó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml a 40°C, 200 rpm durante 68 horas, a continuación se analizó mediante HPLC La disolución contenía 31,9 mg/ml (rendimiento del 68%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

Ejemplo 4

Aminación reductora que utiliza células secas de *Escherichia coli* recombinante que expresan la fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces intermedius* y formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii*

Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 4,0 ml a pH 8,0 (pH ajustado con NH₄OH): formiato de amonio 0,50 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,25 M, NAD 1,06 mM, ditioneitol 1,00 mM, 2,55 unidades/ml (0,51 unidades/mg) de formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim), y 250 mg de células de *Pichia pastoris* secadas térmicamente que contenían 76 unidades de fenilalanina deshidrogenasa determinadas de acuerdo con el Ensayo A. La disolución se incubó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml a 40°C, 100 rpm durante 4 días, a continuación se analizó mediante HPLC. La disolución contenía 7,69 mg/ml (rendimiento del 13,7%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

Ejemplo 5

Aminación reductora usando células húmedas de *Escherichia coli* recombinante y formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii*

Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 3,0 ml a pH 8,0 (pH ajustado con NH₄OH): formiato de amonio 0,415 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,208 M, NAD 0,88 mM, ditioneitol 0,84 mM, 1 unidad/ml (0,51 unidades/mg) de formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim), y 12,5% en p/v de células húmedas de *Escherichia coli* que contenían 97 unidades de fenilalanina deshidrogenasa determinadas de acuerdo con el Ensayo A. La disolución se incubó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml a 40°C, 200 rpm durante 68 horas, a continuación se analizó mediante HPLC La disolución contenía 5,16 mg/ml (rendimiento del 11,0%) de ácido

(S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

Ejemplo 6

Aminación reductora usando fenilalanina deshidrogenasa de *Sporosarcina species* y formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii*

- 5 Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 1,0 ml a pH 8.5 (pH ajustado con NH₄OH): formiato de amonio 0,15 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,05 M (11,2 mg/ml), NAD 1 mM, ditiotreitól 1 mM, 0,51 unidades/ml (0,51 unidades/mg) de formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim) y 1,01 unidades/ml de fenilalanina deshidrogenasa (14,5 unidades/mg; Sigma Chemical Co.) de *Sporosarcina species*. La disolución se incubó a 30°C durante 20 horas. a continuación se analizó mediante HPLC La disolución contenía 0,31 mg/ml (rendimiento del 2,74%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

Ejemplo 7

Construcción del plásmido pBMS2000-PPFDH-PDHmod

- Se empleó una construcción en dos etapas del vector de expresión pBMS2000-PPFDH-PDHmod. El gen FDH de *P. pastoris* se subclonó en el vector de expresión pBMS2000 (pBMS2000 se divulga en la patente de los Estados Unidos N° 6.068.991, concedida el 30 de mayo de 2000 a S.W. Liu y col.) utilizando cebadores oligonucleótidos que contenían los extremos 5' y 3' del gen FDH de *P. pastoris* junto con los sitios de escisión de la endonucleasa compatibles:

5' TCGTCATGAAATCGTTCTCGTTTG 3' (extremo 5'; sentido directo; SEC ID N°:1)

BspHI

5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT 3' (extremo 3'; sentido contrario; SEC ID N°:2)

BamHI

- Se llevó a cabo la amplificación mediante la PCR de alta fidelidad del gen FDH de *P. pastoris* en cuatro alícuotas de 100 µl, conteniendo cada una tampón de reacción 1 X TaqPlus (Stratagene, LaJolla, CA), 0,2 mM de cada uno de desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), 0,4 nM de cada oligonucleótido, 2,5 U de ADN polimerasa TaqPlus (Stratagene), y 10 pg de ADN plásmido que contenía el gen FDH de *P. pastoris* clonado. Las condiciones de amplificación incluyeron la incubación a 94°C durante 4 minutos, seguido por 25 ciclos de incubación a 94°C durante 1 minuto; 50°C durante 1 minuto; y 72°C durante 1,5 minutos, utilizando un termociclador Modelo 480 de Perkin-Elmer con autoextensión.

- Se extrajo la mezcla de reacción de la PCR con un volumen igual de fenol:cloroformo 1:1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) y se centrifugó a 13.000 x g durante 5 minutos, Se eliminó la fase acuosa superior y se colocó en un tubo de microcentrifuga nuevo. Se precipitó el ADN mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío en hielo. Tras centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos, se aspiró el líquido desde el tubo, y el aglomerado se lavó con 0,5 ml de etanol al 70% frío en hielo. Se aspiró el líquido de nuevo, y el aglomerado se dejó secar al aire durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- Se digirió el ADN amplificado con 20 unidades de cada uno de BspHI y BamHI durante 3 horas a 37°C en un volumen total de 50 µl. En paralelo, el vector pBMS2000 (2 mg) se digirió con BspHI y BamHI. Las muestras digeridas se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1,0% durante 2 horas a 100 v. Las bandas correspondientes al gen FDH (fragmento de 1100 pares de bases) y al vector linealizado (fragmento de 4700 pares de bases) se recortaron del gel y se purificaron usando el Kit de Extracción en Gel QIAquick, Chatsworth, CA). Se estimaron las concentraciones de los fragmentos aislados mediante electroforesis frente a la escala de masas de bajo peso molecular (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se ligaron en una relación molar 5:1 (inserto:vector) en un volumen total de 10 µl a 22°C durante 2 horas. Se precipitó el ADN mediante la adición de 15 µl de dH₂O y 250 µl de 1-butanol, y se aglomeró a 13.000 x g en una microcentrifuga durante 5 minutos. Se eliminó el líquido mediante aspiración, y se secó el ADN en un SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NY) durante 5 minutos con calor bajo. El aglomerado se resuspendió in 5 µl de H₂O.

- El ADN resuspendido se transformó mediante electroporación en 0,04 ml de células DH10B de *E. coli* competentes (Invitrogen) a 25 µF y 250 Ω. Se añadió inmediatamente medio SOC (0,96 ml; SOC = extracto de levadura al 0,5%, triptona al 2%, NaCl 10 mM, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄; y 20 mM de glucosa por litro), y se incubaron las células en un agitador durante 1 hora a 37°C y 225 rpm. Se seleccionaron las colonias que contenían ADN plásmido en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Se identificaron los plásmidos con la inserción deseada mediante la PCR de colonias en tubos capilares usando el RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Cada mezcla de reacción contenía 50 µM de Tris-HCl (pH 8.3), 4 mM de MgCl₂, 0,25 mg/ml de albúmina de suero bovino, 2% de sacarosa 400, 0,1 mM de rojo cresol, 0,4 nM de cada cebador (SEC ID N°:1 y SEC ID N°:2), y 2,5 U de ADN polimerasa (Promega Corp., Madison, WI). La mezcla de reacción se dividió en alícuotas de 10 µl, y se pipeteó en los pocillos de una placa de microvaloración de fondo redondeado. Se repicó una colonia resistente a kanamicina usando una aguja de inoculación de plástico desechable, se vertió en la mezcla de reacción, y se transfirió a agar de LB-kanamicina. Cada alícuota de la mezcla de reacción se extrajo en un tubo capilar de 30 µl, y el tubo se selló poniendo a la llama ambos extremos. Se lisaron las células y se

desnaturalizó el ADN mediante incubación a 94°C durante 30 segundos; se llevó a cabo la amplificación usando 30 ciclos de incubación a 94°C durante 0 segundos; 40°C durante 0 segundos, y 72°C durante 60 segundos utilizando un Termociclador RapidCycler (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT). Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1,0% durante 2 horas a 100 v. Siete muestras de las 17 ensayadas mostraron una banda fuerte en 1100 pares de bases. Una colonia que contenía este plásmido (denominado en el presente documento pBMS2000-PPFDH) se escogió para la siguiente etapa en la construcción del plásmido.

"PDHmod" se refiere a una fenilalanina deshidrogenasa modificada de *Thermoactinomyces intermedius* que difiere de la secuencia de ADN publicada (Takada y col., J. Biochem., 109, pp. 371-376, 1991) por un cambio de al menos dos aminoácidos y 12 aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo que se requiere para la conversión completa del ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético a ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético. Este cambio se introdujo en el plásmido pPDH9K/10 (descrito en detalle en la patente WO 200004179, concedida a Donovan y col., el 27 de enero de, 2000), que se transformó posteriormente en *P. pastoris* SMD1168 (depositada como cepa ATCC 74408).

Extremo 3' del gen PDH natural y los aminoácidos correspondientes:

AAC	AGC	GCA	AGG	AGG	TAA
Asn	Ser	Ala	Arg	Arg	Terminación

Extremo 3' del gen PDHmod y los aminoácidos correspondientes (aminoácidos cambiados o nuevos en negrita):

AAC	AGC	GCG	GAG	GGG	TAC	CTC	GAG	CCG	CGG
Asn	Ser	Ala	Glu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Pro	Arg
CGG	CCG	CGA	ATT	AAT	TCG	CCT	TAG (SEC ID NO:5)		
Arg	Pro	Arg	Ile	Asn	Ser	Pro	Terminación		

Se prepararon cebadores oligonucleótidos que contienen el extremo 5' y 3' del gen PDHmod junto con los sitios de la endonucleasa de restricción compatibles:

GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTGAAATGATG (extremo 5', de sentido directo; SEC ID Nº:3)

NdeI

GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTTCG (extremo 3', de sentido contrario; SEC ID Nº:4)

SmaI

Las condiciones de reacción para la amplificación y purificación de PDHmod mediante la PCR fueron idénticas a las utilizadas para el gen FDH de *P. pastoris* excepto en que se incluyó el ADN cromosómico preparado a partir de ATCC 74408 como molde de la reacción. El fragmento resultante se digirió con 20 unidades de cada uno de *NdeI* y *SmaI* durante 1 hora a 25°C, seguido por 2 horas a 37°C, en un volumen total de 50 µl. En paralelo, una versión del vector pBMS2000 con un sitio *NdeI* en el codón de inicio (2 mg) se digirió con *NdeI* y *SmaI* usando condiciones idénticas. Las muestras digeridas se sometieron a electroforesis por separado en un gel de agarosa TAE al 1,0% durante 2 horas a 100 v. Las bandas correspondientes al gen PDHmod (fragmento de 1200 pares de bases) y al vector linealizado (fragmento de 4700 pares de bases) se recortaron del gel y se purificaron usando el Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). Se llevaron a cabo la ligadura de los dos fragmentos, transformación de *E. coli*, y seleccionando las colonias que contenían inserciones con el gen PDHmod (formando pBMS2000-PDHmod) tal como se ha descrito *más arriba*.

Para la construcción de pBMS2000-PPFDH-PDHmod, se escindió pBMS2000-PDHmod (2 µg) con 10 U de cada uno de *HindIII* y *SmaI* en una reacción de 50 µl durante 1 hora a 25°C, seguido por 1 hora a 37°C. Se añadieron diez unidades de ADN polimerasa T4 (Invitrogen) y 2 µl de una mezcla 2,5 mM de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato y se incubó la muestra a 11°C durante 20 minutos. La reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1,0% durante 2 horas a 100 v. El fragmento de 1800 pares de bases se recortó y aisló usando el Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). Este fragmento contiene, en orden, el promotor tac, *groESgene*, y el gen PDHmod (como una fusión de la transcripción). A continuación, se digirió pBMS2000-PPFDH (2 µg) con 10 unidades de la endonucleasa de restricción *SmaI* en un volumen de 50 µl durante 2 horas a 25°C, a continuación se trató con 0,4 U de fosfatasa alcalina de camarón (United States Biochemicals, Cleveland, OH) durante 1 hora a 37°C. El ADN plásmido se sometió a electroforesis durante 2 horas a 100 v en un gel de agarosa TAE al 1,0%, se aisló, y se extrajo con el kit QIAquick. Se ligaron los dos fragmentos en una relación molar 6.5:1 (inserto:vector) a 16°C durante 4 horas en un volumen final de 10 µl. Tras la extracción con 1-butanol y la centrifugación, se transformó el ADN en células D10B electrocompetentes. Se cribaron las colonias resistentes a la kanamicina para determinar la presencia del gen PDHmod con los dos cebadores específicos de PDHmod que se han descrito anteriormente para FDH. Se llevó a cabo un segundo ciclo de cribado de la PCR utilizando cebadores de ADN homólogos al extremo 5' del PPFDH y al extremo 3' del gen PDHmod, respectivamente. Solo las construcciones que pueden soportar la amplificación de un fragmento de 1400 pares de bases poseen los dos genes en la misma orientación. Se encontró uno de dichos plásmidos y se

confirmó la orientación mediante diagnóstico por digestión con restricción con *KpnI*, que proporcionó los fragmentos esperados de 5422 y 1826 pares de bases. Este plásmido se designó "pBMS2000-PPFDH-PDHmod."

Ejemplo 8

Expresión de FDH y PDHmod

5 pBMS2000-PPFDH-PDHmod se transformó en *Escherichia coli* JM110. En estudios con matraces con agitación, se hizo crecer JM110(pBMS2000-PPFDH-PDHmod) durante 18 horas a 28°C, 250 rpm en medio MT5 (2,0% de Yeastamine, se añadieron glicerol al 4,0%, fosfato de sodio al 0,6% [dibásico] fosfato de potasio al 0,3% [monobásico], sulfato de amonio al 0,125%, sulfato de magnesio al 0,0256% [heptahidrato; después de autoclavar a partir de una disolución estéril 1M], y 50 µg/ml de sulfato de kanamicina [añadido después de autoclavar a partir de una disolución de 50 mg/ml esterilizada por filtración]). Se registró la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) y se añadieron al medio de MT5/kanamicina reciente células suficientes para conseguir una DO_{600} de partida de 0,35. Los matraces se agitaron a 250 rpm, 28°C hasta que la DO_{600} fue de 0,8-1,0. Se indujo la expresión de ambos genes mediante la adición de isopropil-β-D galactopiranosido 1M (IPTG) esterilizado por filtración hasta una concentración final de 35 µM y la fermentación continuó durante 24-48 horas. Se aglomeraron las células mediante centrifugación a 6.500 x g durante 5 minutos, se lavaron una vez con un volumen igual a 50 mM de formiato de amonio pH 7,0 y se volvieron a aglomerar. Las células se almacenaron congeladas a -20°C o se usaron inmediatamente. El aglomerado se volvió a suspender en 50 mM de fosfato de amonio, pH 7,0 a 10 ml/g en peso húmedo de células y se sonicó 3 x 15 segundos utilizando un Desmembrador Sónico Fisher Scientific Modelo 50 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), ajuste de potencia 15 con una micropunta. Se aglomeraron los desechos mediante centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se examinó la expresión mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se mezcló un ml del extracto celular con 5 µl de tampón 4X NuPAGE™ LDS (Invitrogen) y se llevó hasta 19 ml con agua destilada. Se calentaron las muestras a 70°C durante 10 minutos. Se añadió a la mezcla 1 ml de una disolución de ditioneitol 1M y se aplicaron 10 µl a un minigel de NuPAGE™ Bis-Tris poliacrilamida al 10%. Se llevó a cabo la electroforesis a 200 v durante 50-60 minutos y se tiñó el gel en una disolución que consistía en Azul de Coomassie al 0,1% (p/v) (Sigma), etanol al 40% (v/v), y ácido acético al 10% (v/v). El gel se sumergió en la tinción, se calentó en un horno microondas hasta que fue evidente la ebullición, a continuación se agitó a 40 rpm en un agitador orbital durante 15 minutos. El gel se lavó intensamente con agua desionizada y se cubrió con disolución de destinción (GelClear™; Invitrogen). La disolución se calentó de nuevo hasta el punto de ebullición y se agitó suavemente durante al menos 2 horas. Se observaron dos bandas prominentes a M_r 43.000 y 40.000 tras la inducción, que correspondían al peso molecular esperado de las subunidades de FDH y PDHmod. Se encontraron también muestras que poseían actividades de FDH y PDH cuando se ensayaron tal como se describe en el Ejemplo 10. Se proporcionó a esta cepa de *E. coli* recombinante la designación interna de SC 16496.

SC 16496 se fermentó posteriormente a volúmenes de 15 y 250 litros. Para una fermentación de 15 litros, un vial que contenía 1 ml de SC 16496 congelado se descongeló a temperatura ambiente y se añadió a 1 litro de medio MT5 que contenía 50 µg/ml de kanamicina en un matraz de 4 litros. El matraz se incubó a 28°C, 250 rpm durante 24 horas y se transfirió a 13 litros de medio MT5 (ingredientes distribuidos en lotes basándose en un volumen final de 15 l) en un fermentador Braun. Sulfato de kanamicina y sulfato de magnesio heptahidratado suficiente para administrar una concentración final de 50 µg/ml y 0,0246%, respectivamente, se disolvieron en 500 ml de agua destilada y se esterilizaron por filtración a través de una unidad de filtración de acetato de celulosa de 0,2 micrómetros. Se añadió la disolución al tanque, seguida inmediatamente por el inóculo. La DO_{600} fue de ca. 0,35.

Los parámetros de funcionamiento de la fermentación fueron los siguientes:
volumen de trabajo de 16 litros
Temperatura: 28°C
Aireación: 1.0 vvm
Presión: 690 mbar
Agitación: 500 rpm
pH del control a 6,8 con NH_4OH según se requiera

Se controló el espumado mediante la adición de UCON (una mezcla de disolventes de fluorocarbono producida por Dow Chemical Company) a demanda.

A una DO_{600} de 0,8-1,0 (aproximadamente dos horas después del inóculo) se añadió IPTG esterilizado por filtración (disuelto en 500 ml dH_2O) asépticamente hasta dar una concentración final de 35 µM. La fermentación continuó durante 48 h más, después el contenido del tanque se subenfrió a 10°C. Se recogieron las células mediante centrifugación y se enjuagaron una vez con 0,1 vol de formiato de amonio 50 mM, pH 7,0. La pasta de células se colocó en recipientes de plástico y se guardó a -70°C hasta que fue necesario.

Para tanques de 250 l, se preparó el inóculo como sigue: se descongeló 1 ml de SC 16496 congelado y se añadió a 300 ml de medio MT5 con 50 µg/ml de kanamicina. El matraz se incubó a 28°C, 250 rpm durante 24 horas. Se determinó la DO_{600} y se eliminó el volumen adecuado de células para dar 80 unidades de DO y se añadió a 250 ml de

medio MT5 reciente. Se añadieron asépticamente las células a 10 l de medio de MT5/kanamicina en un fermentador Braun (OD₆₀₀ inicial ~ 0,008) y se hicieron crecer con los parámetros de funcionamiento de la fermentación descritos *más arriba* durante 16 horas. A continuación se transfirió el cultivo a 250 l de MT5 que contenía las concentraciones adecuadas de kanamicina y sulfato de magnesio. Basándose en el tiempo de duplicación de 90 minutos de SC 16496 en estas condiciones, 10 l de inóculo en 250 l deberían dar una DO₆₀₀ de partida de 0,30-0,35. Inducción, crecimiento, cosecha, y se llevó a cabo el almacenamiento tal como se ha descrito para la fermentación de 15 l.

Ejemplo 8A

Producción escalonada de ácido (αS)-α-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) a partir del ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) al ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) utilizando un concentrado de enzima PDH/FDH aislado

Etapas 1: Aislamiento de un concentrado de enzima PDH/FDH

Se obtuvo caldo de fermentación (30 litros) de *Escherichia coli* JM110(pBMS2000-PPFDH-PDHmod) a partir de un tanque de fermentación de 4000 l y se pasó a través de un microfluidizador (Microfluidics modelo M-110Y, presión de funcionamiento 12.000-20.000 psi (81,6-13,6 MPa) (una pasada) para liberar la actividad de las células manteniendo la temperatura del caldo por debajo de 40°. La actividad PDH/FDH del caldo microfluidizado fue de 32 UI/ml para PDH y de 8 UI/ml para FDH.

Para clarificar el caldo completo, se añadieron 4,5 kg de Celite a caldo bien agitado. A continuación se añadieron 0,201 litros de una disolución acuosa de polietileneimina y se mezclaron durante 30 minutos. A continuación se filtró la mezcla utilizando un filtro prensa (Ertel Alsop modelo 8-ESSC-10) y se obtuvieron 18 litros de filtrado. La torta del filtro se lavó con 12 litros de agua para llevar el volumen hasta 30 litros. El rendimiento de la etapa fue de una recuperación de la actividad del 97% de PDH con una actividad de 31 UI/ml y una actividad de FDH de 8 UI/ml.

El caldo clarificado se ultrafiltró a través de un filtro de tipo casete de 100.000 MWCO (Millipore Pellicon 2 unidades, un casete de polietersulfona de baja unión a proteína, con un área del filtro de 0,5 m²) La tasa de circulación de la bomba fue de 400 ml/min. El filtrado clarificado se concentró hasta 1,5 litros y proporcionó un concentrado de enzima con un título de PDH de 567 UI/ml y un título de FDH de 136 UI/ml. Se ensayó el permeado y no se encontró actividad. La recuperación de la actividad global de la enzima en el concentrado fue del 84%.

Etapas 2: Aminación reductora

Ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) (1,00 kg; 4,46 mol) se añadió a un recipiente de 20 l seguido de agua (5 l). Se agitó la mezcla y se ajustó el pH a pH~8 con NaOH 10N para dar una disolución. Se añadió carbono Darco KBB (100 g) y la mezcla se agitó durante 5 minutos y a continuación se filtró a través de un embudo Buchner con un papel de filtro de 5μ. El filtro se lavó con agua (2x1l) y los filtrados y lavados se combinaron para dar una disolución transparente.

Con agitación, se añadió formiato de amonio (0,562Kg; 8,92 mol) y se volvió a ajustar el pH a ~7,5 con NaOH 10N. Se añadieron nicotinamida adenina dinucleótido (2,65 g) y ditiotreitól (1,54 g). Cuando los sólidos se hubieron disueltos, se añadió un concentrado de enzimas de PDH/FDH (1,03 l; 500.000 UI de PDH). Se volvió a ajustar el pH a ~8,0 con NaOH 10N a temperatura ambiente.

A continuación, la mezcla se volvió a calentar a ~40°C y se diluyó hasta un volumen total de 10 l con agua. El pH se mantuvo a 7,7-8,3 agitando a la vez durante 42 horas. La disolución resultante contenía 0,955 Kg (95,1%) del producto ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V).

Etapas 3: Protección con BOC

Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (1,022kg; 4,68 mol) a una porción de la disolución de ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) (477,5 g; 2,12 mol). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente, con pH ajustado y mantenido a 10 con un valorador de estado del pH usando NaOH 10N. La reacción se completó 4 horas después de la adición de Boc₂O cuando quedaba menos del 1,0% de material de partida.

El pH de la mezcla se ajustó a ~8 con 35% de H₂SO₄ y se añadió i-PrOAc (5,0 l) a la mezcla. El pH de la mezcla se ajustó a continuación a 2,0 con H₂SO₄ al 35% y se mantuvo a este pH durante 5-10 min. Se añadió Dicalite (250 g). La mezcla se agitó durante ~10 min, y a continuación se filtró a través de un parche de Dicalite (250 g) sobre papel de filtro en un embudo Buchner. El parche de Dicalite se lavó adicionalmente con 2,5 l de i-PrOAc.

El filtrado se ajustó a pH 8 con NaOH 10N. Tras sedimentar durante 1 h, se descartó la capa orgánica incluyendo la interfase. Se añadió i-PrOAc (7,5 l) a la capa acuosa. Se acidificó la mezcla con H₂SO₄ al 35% a pH~2, y se calentó a y se mantuvo a -40°C durante 4 horas con agitación suave. Se separaron las capas y se guardó el extracto orgánico. Se extrajo la capa acuosa con la interfase con i-PrOAc (3,75l) y se separaron de nuevo las capas durante 2 horas a 40°C. Se extrajo la capa acuosa con la interfase de nuevo con i-PrOAc (3,75 l) y se separaron las capas después de 2 horas.

a 40°C.

Se concentraron los extractos orgánicos combinados (~15 l) mediante destilación a ~4,5 l. Se añadió a continuación heptano (~10 l) a esta disolución durante 1-15 min a la vez que se mantuvo la temperatura a ~82-89°C. La temperatura de la camisa del reactor se ajustó a 70°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora. La cristalización se produjo poco tiempo después del enfriamiento. A continuación se ajustó la temperatura de la camisa del reactor a 40°C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 min.

La suspensión se enfrió a temperatura ambiente, y a continuación se enfrió a 0-5°C. Después de una hora de agitación a 0-5°C, se filtró el producto. El producto se lavó con heptano (2,5 l), a continuación se secó al vacío a 40°C para dar 607,0g (rendimiento del 88%) de ácido (α S)- α -[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI).

Ejemplo 9

Aminación reductora usando un extracto de *Escherichia coli* SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] recombinante (ATCC Depósito PTA-4520)

Células congeladas de *Escherichia coli* recombinante (25 gramos) se añadieron a agua desionizada (suficiente para llevar el volumen final a 100 ml y que contenían 5 ml de formiato de amonio 1 M). Tras descongelar, las células se suspendieron utilizando un homogeneizador Janke and Kunkel Ultra-turrax T8 que se ajustó a continuación a pH 7 con NH₄OH y se enfrió con hielo picado para dar una suspensión celular a un 25% en p/v en 50 mM de formiato de amonio. Las células se rompieron mediante 2 pases a través de un microfluidizador a 12000 psi (82,74 MPa) y se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación 20.000xg y 4 °C. 266 ml de sobrenadante que contenía 2456 u (ensayo A) o 768 u (ensayo C) fenilalanina deshidrogenasa y se añadieron 8801 u de formiato deshidrogenasa a un frasco de 1 l.

Se preparó una disolución de 266 ml que contenía formiato de amonio (16,74 g, 0,2654 moles) y ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético (29,76 g, 0,1327 moles) y se llevó a pH 8,0 con 12,7 ml de hidróxido de amonio concentrado. Se añadieron NAD (372 mg, 0,561 mmoles) y ditiotreitól (81,8 mg, 0,530 mmoles), a continuación, la disolución se añadió al frasco que contenía el extracto de *Escherichia coli*. La disolución se mantuvo a 40°C en un agitador a 40 rpm. Se añadió periódicamente hidróxido de amonio concentrado para mantener un pH de 8,0. Después de 38 horas la disolución contenía 31,5 gramos (0,140 moles, rendimiento del 100%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético tal como se midió mediante el análisis de HPLC y no hubo enantiómero R del aminoácido.

Ejemplo 10

Aminación reductora usando células secas congeladas de *Escherichia coli* SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] recombinante (ATCC Depósito PTA-4520)

Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 10,0 ml a pH 8,0 (pH ajustado con NH₄OH): formiato de amonio 0,50 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,237 M, NAD 1,00 mM, ditiotreitól 1,00 mM, y 975 mg de *Escherichia coli* recombinante seca criocongelada. Las células se secaron hasta un 26% del peso húmedo. Antes de secar, las células contenían 65,04 unidades/g (ensayo A) de fenilalanina deshidrogenasa, (o 12,79 unidades/g de fenilalanina deshidrogenasa según el ensayo C), y 133,32 unidades/g de formiato deshidrogenasa. Se incubó la disolución en un matraz Erlenmeyer de 50 ml sellado estrechamente a 40°C, 100 rpm durante 3 días, a continuación se analizó mediante HPLC. La disolución contenía 49,06 mg/ml (rendimiento del 92,130%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

Ejemplo 11

Transaminación usando transaminasa de cadena ramificada

Se preparó una disolución que contenía un volumen final de 1,0 ml a en 50 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 8,0, glutamato de sodio 0,10 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,05 M (neutralizado con NaOH 0,05 M), fosfato de piridoxal 0,1 mM, y 1mg de transaminasa de cadena ramificada (Biocatalytics). La disolución se incubó en un tubo de microfuga a 37°C durante 68 horas, a continuación se analizó mediante HPLC. La disolución contenía 5,53 mg/ml (rendimiento del 49,2%) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético y 7,05 mg/ml restantes de ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético.

Ejemplo 12

Ensayo mediante HPLC de la cantidad y exceso enantiomérica del ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético

Se diluyeron las muestras con agua hasta una concentración de aproximadamente 2 mg/ml y se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 1 minuto para detener las reacciones y precipitar las proteínas. Tras el enfriamiento, las muestras se filtraron a través de filtros de nilón de 0,2 micrómetros en viales de HPLC.

Se usaron dos procedimientos de separación.

Procedimiento 1:

columna: Chiralpak WH 25x0,46 cm (Daicel Industries, Ltd.).
 fase móvil: 0,3 mM de CuSO₄
 caudal: 1 ml/minuto
 Temperatura de la columna: 50°C
 detección: detector de matrices por diodos (DAD) ajustado a 240 nm
 volumen de inyección: 10 µl
 Tiempo de retención del ((ácido <aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético): 79.9 minutos
 Tiempo de retención del enantiómero R: 32,8 minutos

Procedimiento 2:

columna: Regis Davankov Ligand Exchange 15x0,46 cm
 fase móvil: 25% metanol/75% CuSO₄ 6mM
 caudal: 1 ml/minuto
 Temperatura de la columna: 40°C
 detección: DAD ajustado a 240 nm
 volumen de inyección: 10 ml
 Tiempo de retención del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético) Tiempo de retención: 3.2 minutos Tiempo de retención del enantiómero R: 11,2 minutos
 Cetoácido (3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético) tiempo de retención: 5,2 minutos

Ejemplo 13

Ensayo A de la fenilalanina deshidrogenasa

El ensayo A de la fenilalanina deshidrogenasa contenía en 1 ml a 40°C: NADH 0,4 mM, fenilpiruvato de sodio 5 mM, NH₄OH 0,75 M ajustado a pH 8,75 con HCl. Se realizó seguimiento de la disminución de la absorbancia a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad de la enzima como µmoles/minuto basándose en las tasas de cambio de la absorbancia.

Ejemplo 14

Ensayo B de la fenilalanina deshidrogenasa

El ensayo B de la fenilalanina deshidrogenasa contenía en 1 ml a 40°C: NAD 1 mM, L-fenilalanina 10 mM, K₂HPO₄ 0,1 M ajustado a pH 10.0 con NaOH 1 N. Se realizó seguimiento del aumento de la absorbancia a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad de la enzima como µmoles/minuto basándose en las tasas de cambio de la absorbancia.

Ejemplo 15

Ensayo C de la fenilalanina deshidrogenasa

El ensayo C de la fenilalanina deshidrogenasa contenía en 1,0 ml a 40°C: NADH 0,4 mM, 50 mM de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (disuelto en 1 equivalente de disolución de NaOH), NH₄OH 0,75 M ajustado a pH 8,75 con HCl. Se realizó seguimiento de la disminución de la absorbancia a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad de la enzima como µmoles/minuto basándose en las tasas de cambio de la absorbancia.

Ejemplo 16

Ensayo de la formiato deshidrogenasa

El ensayo de la formiato deshidrogenasa contenía en 1,0 ml a 40°C: NAD 1 mM, formiato de amonio 100 mM, tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0. Se realizó seguimiento del aumento de la absorbancia a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad de la enzima como µmoles/minuto basándose en las tasas de cambio de la absorbancia.

Ejemplo 17

Bromación de ácido triciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) a ácido α-bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O)

Se suspendió ácido triciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) (288 gramos; 1,48 moles) en cloruro de tionilo (465 ml) en un matraz de fondo redondo de 3 bocas, equipado con un condensador. Se añadió dimetilformamida (DMF; 0,3 ml) y se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se comprobó la finalización de la reacción mediante cromatografía de gases. A continuación se añadió NBS sólido (307 g) por partes a la mezcla de reacción y se calentó la mezcla de reacción a 60°C. La reacción se agitó durante 3 horas manteniendo a la vez la

temperatura a 60 a 65°C. Se llevó a cabo el seguimiento mediante cromatografía de gases para asegurar la finalización de la reacción. Se añadió heptano (900 ml) a la mezcla de reacción. Se eliminó mediante destilación el cloruro de tionilo en exceso a 78-80°C. A continuación se añadió agua con precaución (reacción violenta) para inactivar rápidamente la reacción (volumen total de 1050 ml). Se añadieron a continuación heptano (500 ml) y agua (600 ml) y se separó la capa acuosa a partir de la capa orgánica. Se lavó la capa orgánica con más agua (600 ml) y se separó de nuevo la capa acuosa de la capa orgánica. Se añadió más agua (150 ml) a la capa orgánica de heptano y se eliminó el heptano de la capa acuosa mediante destilación. Específicamente, 70 ml de agua se destilaron simultáneamente con el heptano. Tras eliminar mediante destilación el heptano, se añadió tetrahidrofurano (THF: 1200 ml) a la capa acuosa y se agitó intensamente la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas para retrasar la hidrólisis. El seguimiento mediante cromatografía de gases indicó la presencia de parte de cloruro de ácido sin reaccionar. A continuación se añadió más agua para acelerar la hidrólisis y se realizó seguimiento de la reacción mediante cromatografía de gases para asegurar la finalización. A continuación se eliminó mediante destilación el THF dando como resultado una mezcla de reacción bifásica (agua y aceite). A continuación se añadieron semillas y se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente para que apareciera un sólido pesado. Se añadieron agua (250 ml) y acetonitrilo (500 ml) para mantener la suspensión agitable a medida que la suspensión se agitaba durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación el sólido se eliminó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo (2X250 ml). Este filtrado contenía el primer cultivo del ácido α -bromotriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula O); 264 gramos con AP 95 con un rendimiento del 66% tras secar a vacío a temperatura ambiente. se trituró a continuación el residuo del licor madre (113 gramos de residuo) con agua y acetonitrilo (250 ml/250 ml) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. A continuación se filtró la reacción y se secó el sólido para obtener un segundo cultivo de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético 64 gramos con AP 90 con un rendimiento del 16 %.

Ejemplo 18

Preparación de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) a partir de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula O)

Se introdujeron en un matraz Erlenmeyer 315 ml de H₂SO₄ al 95-98% y a continuación se enfrió a 8°C en un baño de hielo. A continuación se añadió HNO₃ (35 ml de una disolución al 50% preparada añadiendo 50 ml de HNO₃ al 70% a 30 ml agua) al matraz manteniendo la mezcla en un baño de hielo a 8°C. A continuación se añadió ácido α -bromotriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) (92 gramos, 0,338 moles) a la mezcla en porciones durante aproximadamente 30 a 60 minutos de tal manera que la temperatura permaneció por debajo de 28°C. A continuación se agitó la reacción calentando con calentamiento a 60°C hasta que se obtuvo una disolución transparente.

Se realizó seguimiento del progreso de la reacción tanto mediante cromatografía en capa fina (TLC) como mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se llevó a cabo la TLC con gel de sílice utilizando acetato de etilo/metanol/hexanos a una relación de 9:1:10 con KMnO₄. Se llevó a cabo la HPLC utilizando una columna ODS, C18 S-3 120A, 4,6 x 50 mm, un gradiente lineal de acetonitrilo al 10%/H₂O a acetonitrilo al 100% en 7 minutos, y un caudal de 2,5 ml/minuto. La longitud de onda de detección fue a 220 nm.

Cuando se completó la reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se mantuvo así durante aproximadamente 16 horas. A continuación se añadió agua (700 ml) para inactivar la reacción hasta que no hubo desprendimiento de gases de color marrón. La suspensión resultante se enfrió en un baño de hielo a aproximadamente 5°C y a continuación se filtró. El filtrado sólido se lavó con 200 ml de agua y se secó al aire para dar como resultado 90 gramos de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) como un sólido de color amarillo claro (rendimiento del 92%).

Ejemplo 19

Preparación de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula (V) a partir de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q)

Ácido α -Bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) (75 gramos, 0,278 moles) se disolvió en 225 ml de hidróxido de amonio al 30% (4,08 moles, 14,6 equivalentes). La mezcla de reacción se calentó a continuación a 65°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a continuación en un rotavapor hasta un sólido. Se añadió EtOH (200 ml) al sólido concentrado y a continuación se volvió a concentrar en un rotavapor. El rendimiento fue de 71 gramos de una mezcla quiral de ácido hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula (V) como un sólido de color amarillo (90%).

Ejemplo 20

Resolución del ácido hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Fórmula (V)

Se llevó a cabo la protección con Boc de la mezcla quiral del Ejemplo 19 utilizando anhídrido de Boc e hidróxido de sodio en tetrahidrofurano. El compuesto resultante, ácido α -[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3]hidroxitriciclo[3.3.1.^{1,3,7}]decano-1-acético (Compuesto R) (0,25 M en EA, 80 μ l, = 6,52mg) se mezcló con la base quiral ([1R,2S]-(-)-1,2-difenil-hidroxi etilamina) (0,25M, 80 μ l) en un vial y la mezcla se evaporó hasta sequedad en el SpeedVac. Se añadió disolvente (200 μ l). El vial que contenía la mezcla se colocó en un agitador con calentamiento a

50°C durante 1,5 horas. La mezcla se enfrió a continuación a temperatura ambiente para la cristalización del ácido α -(α -[dimetiletoxi]carbonil)amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto S).

Ejemplo 21

Acoplamiento de bromuro de adamantilo catalizado por ZnCl₂ (Fórmula A)

- 5 Se introdujeron en un recipiente seco 7,5 kg de bromuro de adamantilo. Se añadió a continuación cloruro de metileno (22,5 litros) a temperatura ambiente para disolver el bromuro de adamantano sólido. La disolución es endotérmica de tal manera que, antes de la siguiente etapa, se dejó que la temperatura de la mezcla de reacción retornara a 20°C. A continuación se introdujo cloruro de cinc (1,05 kg) en la mezcla de reacción y se agitó durante aproximadamente 5 minutos a 20°C. A continuación se introdujo tris(trimetilsiloxi)-etileno (15,3 kg) en la mezcla de reacción manteniendo a la vez la temperatura de reacción entre 20 y 25°C y la mezcla resultante se agitó durante 2 horas. Tras esta mezcla, se añadió tris(trimetilsiloxi)-etileno (5,10 kg). Durante esta adición, la temperatura se mantuvo por debajo de 30°C. La reacción se mantuvo durante otras 12 a 15 horas a 20 a 25°C, momento en el que la mezcla de reacción se diluyó con cloruro de metileno (15 litros) y se enfrió a 0 a 5°C. A continuación se trató la mezcla de reacción, al principio como gota a gota, con una disolución de NH₄Cl semisaturada. Durante la adición, la temperatura se mantuvo por debajo de 30°C. Se obtuvo una suspensión espesa. A esta suspensión se añadió acetato de etilo (93,75 litros). La mezcla se agitó intensamente durante 15 minutos y se dividieron las fases orgánica y acuosa. Se guardó la capa orgánica y la capa acuosa se lavó dos veces con acetato de etilo (18,75 litros en cada lavado). Los lavados de acetato de etilo y la capa orgánica se combinaron a continuación y se lavaron con agua (37,5 litros) seguido por agua semisaturada con salmuera (37,5 litros). La capa orgánica se separó de nuevo y se evaporó hasta formar cristales. A continuación se llevó a cabo un intercambio de disolvente a heptano a un volumen final de 22,5 litros. La suspensión resultante se enfrió a 5 a 10°C durante 1 hora y se obtuvo el producto ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) mediante filtración. El rendimiento del ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) fue de 6,96 kg (33,11 mol. 95%).

Ejemplo 21A

25 Esterificación del ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B)

- Se creó en primer lugar una atmósfera inerte en el reactor. A continuación el reactor se cargó con metanol (35,00 litros) seguido por ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) (14,00 kg) para formar una suspensión. La suspensión se enfrió a 0 a 5°C y se añadió cloruro de acetilo de tal manera que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo entre 5 y 10°C. Tras la finalización de la adición de cloruro de acetilo, la mezcla de reacción se calentó a 20 a 25°C y se agitó durante 2 horas a 20 a 25°C. La mezcla de reacción se concentró a continuación a vacío a 40°C y se obtuvo un aceite fino. El aceite se disolvió en acetato de etilo (71,96 litros) y se llevó a temperatura ambiente. La mezcla resultante se lavó dos veces en agua (28,78 litros cada lavado) y las capas orgánica y acuosa se separaron después de cada lavado. La capa orgánica se guardó mientras que las capas acuosas se combinaron y ajustaron a un pH de 9,5 con una disolución de NaOH 3 N. Las capas acuosas combinadas se extrajeron a continuación dos veces con acetato de etilo (14,39 litros con cada extracción). Después de cada extracción, las capas orgánicas se separaron y se combinaron con la capa orgánica guardada. Estas capas orgánicas combinadas se lavaron a continuación con una disolución de bicarbonato de sodio saturado (28,78 litros) seguido por salmuera (43,18 litros). A continuación se eliminaron todos los compuestos volátiles a vacío a 40°C y se obtuvo un aceite incoloro a un color ligeramente amarillo que cristalizó en reposo. Este aceite contenía 13,29 kg (59,26 mol, 89%) de ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula C).

Ejemplo 22

Oxidación de Swern del éster metílico del ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula C).

- Se equipó un matraz de tres bocas (22 litros) con un agitador mecánico, sonda de temperatura y embudo de adición y se purgó con nitrógeno durante la noche. A continuación se añadió cloruro de oxalilo (500 ml, 5,73 mol) seguido por CH₂Cl₂ (8 litros). La disolución resultante se enfrió a -69°C con un baño de hielo seco/acetona. A continuación se añadió lentamente una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO 700 ml 9,86 mol) durante aproximadamente 30 minutos manteniendo a la vez la temperatura interna por debajo de -60°C. La disolución se agitó durante 20 minutos manteniendo a la vez la temperatura de -60 a -70°C. Una disolución de éster metílico del ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula C) (990 gramos, 4,42 mol) en CH₂Cl₂ (1,7 litros) se añadió a continuación lentamente durante aproximadamente 30 minutos manteniendo a la vez la temperatura interna por debajo de -60°C. La disolución resultante se agitó durante 30 minutos. Se añadió a continuación NEt₃ (3 litros, 21,5 mol) para formar una suspensión pesada de sal de clorhidrato de trietilamina. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se añadió agua (1 litro) para disolver la sal de trietilamonio (sal TEA). La mezcla de reacción se transfirió a continuación a un matraz de fondo redondo, y se concentró para eliminar el diclorometano (DCM) y NEt₃. Se añadió EtOAc (12 litros) y las capas acuosa y orgánica resultantes se dividieron. La capa orgánica se lavó tres veces con agua (2 litros cada lavado) seguido por un lavado de salmuera (2 litros). A continuación la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro con evaporación para producir un sólido de color ligeramente amarillento del éster metílico del ácido α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula D). El rendimiento fue aproximadamente del 104%.

Ejemplo 23

Hidroxilación del éster metílico del ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula D) al éster metílico del ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula I),

Se cargó un matraz Erlenmeyer con 95 a 98% de H₂SO₄ (495 ml) y se enfrió en un baño de hielo a 8°C. HNO₃ (47,5 ml de una disolución al 50% preparada añadiendo 50 ml de HNO₃ al 70% a 30 ml of agua) se añadió a continuación al matraz y la mezcla se enfrió de nuevo a 8°C en el baño de hielo. Ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula C) (100 gramos, 0,45 moles) se añadió lentamente a la mezcla por partes durante 30 a 60 minutos para mantener una temperatura menor de 28°C. La mezcla de reacción se agitó enfriando a la vez en el baño de hielo. Se realizó seguimiento del progreso de la reacción tanto mediante cromatografía en capa fina (TLC) como mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Para la TLC, se utilizó un gel de sílice y el disolvente fue EtOAc/MeOH/Hexano (9/1/10); KMnO₄. Para la HPLC, se usó una columna de 4,6 x 50 mm C18, 3 micrómetros, 120 angstrom con un gradiente de acetonitrilo/H₂O al 10% hasta acetonitrilo al 100% en 7 minutos a un caudal de 2,5 ml/minutos. La longitud de onda de seguimiento fue a 200 nm. Cuando se completó la reacción (después de aproximadamente en 1 hora), La reacción se inactivó rápidamente mediante la adición de agua fría (1,5 litros) y EtOAc (500 ml). Se añadieron más agua y EtOAc (500 ml cada uno) para ayudar en la separación de las capas acuosa y orgánica. A continuación se extrajo la capa acuosa con 3 alícuotas, de 500 ml cada una, de EtOAc. Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con salmuera (400 ml). La capa orgánica lavada se concentró a continuación a presión reducida hasta 130 gramos de un residuo oleoso de color amarillo que contenía el éster metílico del ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula I),

Ejemplo 24

Hidrólisis del éster metílico del ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula I) al ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)

El residuo oleoso de color amarillo del ejemplo 23 se disolvió en tetrahydrofurano (300 ml) y se enfrió en un baño de hielo a 5°C. Se añadió un litro de hidróxido de sodio 1 N lentamente a la disolución para ajustar el pH a aproximadamente 7 manteniendo a la vez la temperatura por debajo de 30°C. A continuación se añadieron 500 ml de NaOH 1N para ajustar el pH a aproximadamente 14. A continuación se agitó la mezcla de reacción enfriando a la vez en un baño de hielo y se realizó seguimiento del progreso mediante TLC o HPLC tal como se describe en el Ejemplo 23. Cuando se completó la reacción después de aproximadamente 30 minutos), se añadió EtOAc (500 ml) y se separaron las capas acuosa y orgánica. La capa acuosa se lavó con otros 500 ml de EtOAc. Se acidificó la capa acuosa con HCl concentrado. Cuando la disolución alcanzó pH 7, se añadió EtOAc (500 ml) seguido por HCl más concentrado hasta que el pH alcanzó 0,7. El HCl concentrado total añadido fue de 150 ml. A continuación se extrajo la capa acuosa con EtOAc (4 x 400 ml) y se lavaron las capas orgánicas combinadas con 400 ml de agua seguido por 400 ml de salmuera. A continuación se secó la capa orgánica lavada con MgSO₄ y se concentró. El rendimiento fue de 88 gramos como un sólido de color ligeramente amarillento. La disolución de este sólido en 100 ml de EtOAc y 300 ml de heptano con agitación durante 30 minutos seguido por filtración y secado con aire dieron como resultado 85 gramos de un sólido de color castaño (85% de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)).

Ejemplo 25

Preparación del éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII)

Se cargó un matraz de 2 litros con tres bocas equipado con un agitador mecánico, termómetro, condensador, embudo de adición para equilibrar la presión y una entrada de argón con polvo de cinc (78,0 g, 1,19 mol) seguido por la adición de tetrahydrofurano anhidro (400 ml). Se añadió a esta mezcla 1,2-dibromometano (2 ml) para activar el cinc. Se calentó la mezcla resultante a reflujo suave durante 25 minutos. Tras enfriar a -55°C, se añadió una disolución de tricloroacetato de metilo (100,3 g, 0,565 mol) y clorotrimetilsilano (80 ml, 0,648 mol) a una velocidad para mantener la temperatura de reacción a -55 a -60°C (requerido 1 hora). Tras completar la adición, se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos. La mezcla resultante se diluyó con heptano (700 ml) y se filtró bajo atmósfera de nitrógeno a través de una almohadilla de celite 545. La torta del filtro se lavó con más heptano (1 x 300 ml 3 x 200 mm) A continuación se concentró el filtrado a presión reducida en un evaporador rotatorio (aproximadamente 10-15 mm de Hg (1.33-2,0 kPa) con un baño de agua a 22-27°C) para dar el (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano como un aceite denso (129,2 g). La RMN cuantitativa de protones indica que este material bruto contiene 0,389 mol (68.8%) de (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano.

Se cargó un matraz de 1 litro equipado con una entrada de argón con (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano bruto (129,1 g, aproximadamente 0,389 moles) y diclorometano anhidro (100 ml). A la disolución resultante se añadió 1-bromoadamantano (75,2 g, 0,349 moles) y cloruro de cinc anhidro (6,56 g, 48 mmol). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de color rojo-marrón resultante se diluyó con heptano (600 ml) y agua (300 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con agua (2 x 100 ml), bicarbonato de sodio 1 N (3 x 150 ml), y agua (2 x 200 ml). La disolución resultante se filtró a través de una almohadilla de celite 545 y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un sólido incoloro. Este material se disolvió en metanol en ebullición (250 ml). La disolución resultante se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Tras enfriar a

aproximadamente 5°C durante 2 horas, el sólido se recogió mediante filtración y se lavó con metanol:agua frío (94:6 4 x 50 ml) para dar el éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII) como un sólido incoloro: 75,0 gramos (77,3% basado en 1-bromoadamantano); pf 76,3°C

Análisis elemental: C₁₃H₁₈Cl₂O₂:

Calculado:	C, 56,33; H, 6,55; Cl, 25,58%
Encontrado:	C, 56,49; H, 6,59; Cl, 25,72%
RMN ¹ H (500,16 MHz, CDCl ₃) δ	3,855 (s, 3H), 2,069 (br s, 3 H), 1,866 (d, J = 2,75 Hz, 6 H), 1,683, 1,612 (AB q, J=12.1 Hz) ppm
RMN ¹³ C (127,78 MHz, CDCl ₃) δ	166,130, 95,805, 53,969, 43,980, 36,842, 36,256, 28,309 ppm

5

Ejemplo 26

Preparación del éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VII)

Preparación de HNO₃ 10 N Se cargó un matraz aforado de 100 ml con HNO₃ conc. (88,25 g, ~62,58 ml), ~1,0 mol) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió agua (35 ml). Tras el calentamiento de la mezcla, la disolución que se había disipado, se dejó calentar a temperatura ambiente. Se preparó el matraz hasta la marca con agua para dar HNO₃ 10 N.

10

Un matraz de tres bocas de 250 ml equipado con un termómetro termopar se cargó con H₂SO₄ conc. (103 g, ~56 ml). Tras enfriar a 0,4°C en un baño de hielo, se añadió HNO₃ 10 N (5,68 ml, 56,8 mmol) durante 30 minutos. Cuando la temperatura de esta mezcla ácida disminuyó a ~1,0°C, se retiró el baño frío. Se añadió metil éster de adamantan-1-il-dicloro-acético de fórmula VII (15,0 g, 54,11 mmol; se molió ligeramente con la mano de un mortero para desmenuzar grandes trozos/cristales) por partes (1,25 g tiempo de adición 1 h 50 minutos). Después de ~5 horas la mezcla de reacción fue, una disolución de color amarillo pálido transparente,

15

Tras agitar durante -24 horas la mezcla de reacción fue una disolución de color amarillo pálido transparente. Se cargó un matraz Morton de cuatro bocas (1 L) equipado con un agitador mecánico y un termómetro termopar con agua (250 ml) y urea (8,0 g, 0,133 moles). ~2.34 equivalentes con respecto a HNO₃). A la disolución resultante se añadió acetato de etilo (230 ml). La mezcla bifásica resultante se enfrió a ~1,0°C en un baño de hielo. Se añadió la mezcla de reacción anterior a la mezcla de EtOAc/agua/urea fría durante ~15 minutos. La transferencia se completó usando más acetato de etilo y agua (~50 ml de cada uno). Tras agitar durante -45 minutos, se retiró el baño frío y se dejó calentar la mezcla con agitación. Después de agitar durante 4,5 horas (a partir del inicio de la inactivación), la mezcla resultante se transfirió a un embudo separador (1 l) usando acetato de etilo adicional (~100 ml) hasta completar la transferencia. Se retiró la fase acuosa y se extrajo con acetato de etilo (1 x 80 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron y lavaron con agua (2 x 90 ml), NaHCO₃ 1 N (4 x 90 ml), y salmuera. Tras secar con sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se eliminó a presión reducida para dar el metil éster del éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula VIII como un sólido casi incoloro: 15,67 g (98.7% de rendimiento bruto). Este material bruto se puede usar para preparar dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Formula IX sin purificación. Si se desea, sin embargo, el material bruto (15,65 g) se puede recristalizar en metanol (102 ml) y agua (85 ml) para dar como resultado un sólido de tipo algodón esponjoso (pf 114,8-115,0°C) con 91% de recuperación.

20

25

30

Análisis elemental: C₁₃H₁₈Cl₂O₃:

Calculado:	C, 53,25; H, 6,18; Cl, 24,18%
Encontrado:	C, 53,24; H, 6,24; Cl, 24,31%
RMN ¹ H (500,16 MHz, CDCl ₃) δ	3,857 (s, 3H), 2,298 (br m, 2 H), 1,824 (s, 2 H), 1,793 (d, 4 H, J = 2,75 Hz, 1,682, 1,629 (br AB q, 4 H), 1,529 (m, 3 H) ppm
RMN ¹³ C (127,78 MHz, CDCl ₃) δ	165,929, 94,281, 68,932, 54,150, 44,478, 44,529, 44,020, 35,750, 34,759, 30,149 ppm

HPLC de Lab:

YMC ODS-A S3 120 A (4,6 x 50 mm), λ= 200 nm; 2,5 ml/minuto

35

Disolventes A = H₃PO₄ al 0,2% en agua B = CH₃CN al 90% en agua

Gradiente: 20% de A a 100% de B durante 10 minutos

Tiempo retención	Área %	Identidad
2,06 minutos	1,19	desconocido
4,54 minutos	98,16	éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi- adamantan-1-il)-acético
5,09 minutos	0,65	desconocido
8,35 minutos		éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético

Ejemplo 27**Preparación del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX)**

Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con metanol (200 ml) y NaOH 1 n (194 ml, 194 mmol, aproximadamente 1.36 equivalentes con respecto a la entrada de éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII)). Se enfrió la disolución resultante en un baño de hielo hasta que la temperatura fue de <9°C. Se retiró el baño frío y se añadió el éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII, 41,68 g, 142,1 mmol). La suspensión resultante se dejó agitar a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Tras agitar durante aproximadamente 6 horas, se usó una porción adicional de metanol (10 ml) para enjuagar las paredes del recipiente. Tras agitar durante aproximadamente 17 horas, la mezcla de reacción se filtró para eliminar una pequeña cantidad de material particulado. La disolución resultante se transfirió a un matraz de tres bocas de 2 litros equipado con un agitador mecánico. Se usó agua (900 ml) para diluir la mezcla de reacción y para competir la transferencia. Se acidificó la disolución resultante mediante la adición de HCl concentrado (38 ml, aproximadamente 456 mmol). Se formó rápidamente un sólido de color blanco. La mezcla se agitó suavemente durante aproximadamente 20 minutos y a continuación se colocó en un baño de hielo. Tras agitar suavemente durante aproximadamente 90 minutos, el agitador se detuvo y se dejó reposar la mezcla en un baño de hielo durante 2 horas más. La suspensión resultante se filtró y la torta del filtro se lavó en agua fría con hielo. Se eliminó el volumen del agua desde el sólido impulsando el aire a través de la torta del filtro. A continuación se secó el material a vacío a temperatura ambiente durante 22 horas para dar el ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX) como un sólido pulverulento incoloro. 39,19 gramos (rendimiento del 98,7%); pf 238°C (dec)

20 Análisis elemental: C₁₂H₁₆Cl₂O₃:

Calculado: C, 51,63; H, 5,77; Cl, 25,40%

Encontrado: C, 51,43; H, 5,74; Cl, 25,48%

HPLC de Lab:

YMC ODS-A S3 120 A (4,6 x 50 mm), λ 200 nm; 2,5 ml/minuto

Disolventes A = H₃PO₄ al 0,2% en agua B = CH₃CN al 90% en agua

25 Gradiente: 20% de A a 100% de B durante 10 minutos

Tiempo retención	Área %	Identidad
0,53 minutos	0,95	desconocido
2,65 minutos	97,27	ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético
4,54 minutos		éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético
RMN ¹ H (500,16 MHz, CD ₃ OD) δ	2,258 (br s, 2 H), 1,858 (s, 6 H), 1,674, 1,615 (br AB q, J = 11,54 Hz, 4 H), 1,588-1,526 (m, 2 H) ppm	
RMN ¹³ H (125,77 MHz, CD ₃ OD) δ	167,957, 96,356, 69,322, 48,070, 45,360, 44,794, 37,050, 36,039, 31,631 ppm	

Ejemplo 28**Preparación del ácido 3-Hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)**

Se cargó un matraz de tres bocas de 500 ml con ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX) (38,67 g, 138,5 mmol). Se añadió a este material agua (160 ml) y NaOH 1 N (138 ml, 138 mmol; se usó NaOH 1 N para generar la sal de sodio del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético para evitar problemas de espumado que podrían aparecer con el NaHCO₃ sólido) para dar una disolución turbia. Se añadió a esta disolución NaHCO₃ sólido (29,10 gramos, 346 mmol, 2,50 equivalentes). Se añadió después el NaHCO₃ a la mezcla de reacción que se convirtió en una suspensión a medida que la sal de sodio del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético salía de la disolución. El recipiente de reacción se equipó con un condensador a reflujo/entrada de argón y se calentó hasta aproximadamente 80°C. Tras calentar durante aproximadamente 6 horas, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. La mezcla de reacción (pH 7,22) se acidificó cuidadosamente (desprendimiento de CO₂ a un pH de 0,15 por adición de HCl concentrado (requerido 32 ml). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (4 x 300 ml). El pH de la capa acuosa (pH 0,37) tras la primera extracción con acetato de etilo disminuyó a 0,18 por adición de HCl concentrado (aproximadamente 2 ml). Se combinaron las fracciones de acetato de etilo y se lavaron y con salmuera (100 ml). Tras secar con sulfato de magnesio anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida para dar el ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) como un sólido incoloro granular: 30,77 gramos (99%).

Análisis elemental: C₁₂H₁₆O₄:

Calculado: C, 64,27; H, 7,19%
 Encontrado: C, 64,30; H, 7,13%
 RMN¹H (500,16 MHz, D₂O) δ 2,288 (br s, 1,33 H), 2,227 (br s, 0,67 H), 1,819-1,575 (m, 12 H) ppm -hidrato parcial
 RMN¹³C (125,77 MHz, D₂O) δ 207,704, 174,583, 169,608, 98,109, 69,618, 68,830, 47,538, 43,716, 43/251, 43,190, 42,907, 42,563, 36,073, 34,677, 34,232, 30,006, 29,865 ppm -hidrato parcial

HPLC de Lab:

YMC ODS-A S3 120 A (4,6 x 50 mm), λ = 200 nm, 2,5 ml/minuto

5 Disolventes A = H₃PO₄ al 0,2% en agua B = CH₃CN al 90% en agua

Gradiente: 10% de A a 60% de B durante 10 minutos

Tiempo retención	Área %	Identidad
1,39 minutos	100%	ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decano-1-acético,
4,95 minutos		ácido dicloro-(3-hidroxi-admantan-1-il)-acético

Ejemplo 28A

10 Preparación de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1³⁷]decano-1-acético (Fórmula II) empleando un procedimiento en un recipiente

Un matraz de tres bocas de 250 ml equipado con un embudo de adición para equilibrar la presión y entrada de argón se cargó con éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)acético (Fórmula VIII), preparado tal como se describe en el Ejemplo 26 (15 g, 51,16 mmol) seguido por la adición de tetrahidrofurano (30 ml, inestabilizado) Tras agitar durante algunos minutos, el volumen del metil éster de la Fórmula VII se disolvió hasta dar una disolución turbia. Se añadió a esta disolución agua destilada (30 ml) y se formó una suspensión suelta. El embudo de adición se cargó con NaOH 1n (69 ml, 69 mmol, -1.35 eq con respecto a la entrada de compuesto de la Fórmula VIII). Se añadió NaOH gota a gota durante 70 minutos para dar una disolución casi incolora que se dejó agitar a temperatura ambiente.

15 El análisis por HPLC a las -16 horas mostró la hidrólisis del compuesto de Fórmula VIII completo. Se preparó la mezcla de reacción. Una disolución incolora transparente con un pH de 13,24 se ajustó a pH 7,40 mediante la adición de HCl 6 N (2,8 ml). NaHCO₃ sólido (11,2 g, 0,133 mol, 2.60 eq) se añadió hasta formar una suspensión.

20 El análisis de HPLC tras calentar durante 4 h 15 min muestra que se completó la reacción. Tras calentar durante 5 horas, se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar la mezcla de reacción (disolución incolora, transparente. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se guardó en un refrigerador (+4°C) durante 4 días.

25 Tras el almacenamiento en frío durante 4 días, la mezcla de reacción era aún una disolución incolora transparente y el análisis de HPLC mostró poco cambio, en caso de existir alguno, tras el almacenamiento. Tras calentar a temperatura ambiente, La mezcla (pH 7,77) se acidificó a un pH de 0,20 mediante la adición cuidadosa de HCl concentrado (requerido 11 ml, desprendimiento de CO₂, a un pH ~1,40 comenzó a precipitar un sólido incoloro). La suspensión resultante se extrajo con EtOAc (x 4, volumen total de ~500 ml; análisis de HPLC llevado a cabo sobre la fracción acuosa tras cada extracción de EtOAc). La capa acuosa (pH 0,38) tras la 1^a extracción de EtOAc se ajustó a pH 0,18 mediante la adición de HCl conc. (-1,6 ml requerido). La capa acuosa (pH 0,37) tras la 2^a extracción de EtOAc se ajustó a pH 0,17 mediante la adición de HCl conc. (~0.8 ml requerido). La capa acuosa no requirió ajuste de pH adicional tras las extracciones de EtOAc restantes (extracción n° 3, pH 0,19; extracción n° 4 pH 0,19). Se combinaron las fracciones orgánicas. Tras secado (MgSO₄), se eliminó el disolvente a presión reducida para dar el compuesto del título bruto de la Fórmula II como un sólido casi incoloro, granular que se secó a vacío (bomba) durante 16 horas: 11,42 g (99.53% de rendimiento). HPLC, 100% (área %)

35 Análisis elemental: C₁₂H₁₆Cl₂O₃ [55465-020-31, TR46373]

Calculado: C, 64,27%; H, 7,19%
 Encontrado: C, 64,19%; H, 7,09%

40 El compuesto bruto de Fórmula II (5,0 g) se disolvió con calentamiento a -85°C en agua destilada (19 ml), a continuación se eliminó de la fuente de calor y se dejó enfriar. A ~53°C, el material comenzó a cristalizar. Tras reposar a temperatura ambiente durante ~2 horas, El sólido se recogió mediante filtración y se lavó con agua fría. Se eliminó el volumen del agua impulsando nitrógeno a través de la torta del filtro. A continuación se secó el material a vacío

(bomba) durante 17 horas para dar el compuesto del título de Fórmula II como agujas grandes, incoloras. 4,33 g (recuperación del 86,6%); pf 164,5-165,6°C (en el sistema Mettler FP800); HPLC, 100% (área %)

Análisis elemental: C₁₂H₁₆Cl₂O₃ [55465-023-15, TR46905]

Calculado: C, 64,27%; H, 7,19%

Encontrado: C, 64,42%; H, 7,04%

5 Ejemplo 29

Esterificación de ácido L-piroglutámico (Fórmula E) para formar etil éster del ácido L-piroglutámico (Fórmula F)

Se cargó un recipiente de reacción con etanol (49,0 litros) y se enfrió a -5°C. A continuación se cargó el recipiente de reacción con cloruro de tionilo (4,97 kg) de manera que la temperatura de la mezcla no excediera de 0°C. Tras la adición completa del cloruro de tionilo, se enfrió la mezcla de nuevo a -5°C y se añadió ácido L-piroglutámico (Fórmula E) por partes de tal manera que la temperatura se mantuviera entre 0 y -5°C durante la adición. Tras la adición del ácido, se calentó la mezcla de reacción a 20 a 25°C y se agitó durante 5 horas. La mezcla de reacción se evaporó a continuación a vacío (T máx. 45°C) hasta aproximadamente un 15% de su volumen original. El aceite restante se disolvió a continuación en tolueno (49 litros). A continuación se enfrió la disolución de tolueno a aproximadamente 10°C y se añadió trietil amina (8,45 kg) lentamente de tal manera que la temperatura máxima fue entre 20 y 25°C. La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos y a continuación se filtró. La torta del filtro se lavó con tolueno (aproximadamente 5 litros). El filtrado se redujo a 50°C a vacío hasta un volumen total de aproximadamente 10 litros. Se inició la cristalización mediante la adición lenta de ciclohexano (8 litros) a 50°C y posterior enfriamiento hasta aproximadamente 30°C. Tras la formación de las semillas se enfrió la mezcla a 20 a 25°C y se cargó con una segunda porción de 8 litros de ciclohexano. La mezcla se enfrió a continuación a 6 a 8°C, se agitó durante una hora, y los cristales resultantes se eliminaron mediante filtración. Los cristales se lavaron dos veces con ciclohexano (4 litros cada lavado). El rendimiento fue de 4,89 kg (82%) de etil éster del ácido L-piroglutámico (Fórmula F) como agujas incoloras.

Ejemplo 30

Protección con BOC del éster etílico de ácido L-piroglutámico (Fórmula F)

El etil éster del ácido L-piroglutámico (Fórmula F) (5,00 kg) se disolvió a temperatura ambiente en tolueno (24,97 litros). A continuación se añadió a la disolución 4-dimetilaminopiridina (0,19 kg). A continuación se cargó la mezcla de reacción con una disolución de anhídrido de BOC (7,29 kg) disuelto en tolueno (24,97 litros) de manera que la temperatura de reacción no excediera de 25°C. Tras la adición completa, la temperatura de reacción se agitó durante tres horas a 25°C. A continuación se cargó la mezcla de reacción con la disolución saturada de NaHCO₃ (49,94 litros) y se agitó intensamente durante 10 minutos antes de separar las fases orgánica y acuosa. La capa orgánica separada se lavó dos veces con agua (24,97 litros cada una). A continuación se evaporó la capa orgánica a partir del disolvente a vacío a un máximo de 50°C. El aceite incoloro a ligeramente amarillento restante cristalizó en reposo. El rendimiento teórico fue de 8,18 kg, (31,81 moles) del 1-(1,1-dimetiletil), 5-etil éster del ácido (5S)-2-oxopirrolidina-1,5-dicarboxílico, (Fórmula G)

35 Ejemplo 31

Reducción y eliminación del superhidruro

El 1-(1,1 dimetiletil) 5-etil éster del ácido (5S)-2-oxopirrolidina-1,5-dicarboxílico (Fórmula G) (4,80 kg) se disolvió en tolueno (30,97 litros; Kf máx. 0,01 % de agua), y se enfrió a -50°C. Esta disolución se cargó con superhidruro (LiEt₃BH 1 M en THF; 19,96 litros) de manera que la temperatura de reacción no excediera de -45°C. Tras la adición completa, se agitó la mezcla a -45 a -50°C durante 30 minutos. Se añadió a continuación N-etildiisopropilamina (DIPEA; 14,47 litros) a la mezcla de reacción de manera que la temperatura no excediera de -45°C. Se añadió dimetilaminopiridina (0,030 kg) como un sólido a la mezcla. A continuación se cargó la mezcla de reacción con anhídrido trifluoroacético (TFAA) (4,70 kg) de manera que la temperatura de reacción no excediera de -45°C. Tras la adición completa. La mezcla de reacción se calentó a 20 a 25°C durante una hora y se mantuvo durante 2 horas más a esta temperatura. A continuación la mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se introdujo lentamente agua (48,00 litros) de manera que la temperatura de reacción no excediera de 5°C. A continuación se separaron las fases acuosa y orgánica y la fase orgánica se lavó de nuevo con 48 litros de agua (0 a 5°C). La capa orgánica se evaporó a continuación y se desgasificó a 40°C. Se obtuvo un aceite amarillento con un rendimiento de 4,5 kg (18,66 mol, 100%) del 1-(1 -dimetiletil), 5-etil éster del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, (BOC- DHPEE) (Fórmula III).

50

Ejemplo 32**Hidrólisis de BOC-DHPEE (Fórmula III)**

Una disolución preparada a partir del 1-(1,1-dimetiletil), 5-etil éster del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico (BOC-DHPEE) (Fórmula III) (6,00 kg) y etanol (24,00 litros) se enfrió a 0 a 5°C y se trató lentamente a esta temperatura con una disolución de hidróxido de litio hidratado (2,09 kg) en agua (20,87 litros) para producir una disolución turbia. Esta disolución turbia se calentó a 20 a 25°C y se agitó durante 2 horas a esta temperatura. A continuación la mezcla de reacción se evaporó hasta un volumen de aproximadamente 10,5 litros a una temperatura máxima de 40°C a vacío y se introdujo agua (24,00 litros) y t-butilmetil éter (TBME o MTBE), (24 litros) y se mezcló durante 10 minutos. Las fases orgánica y acuosa resultantes se separaron y la fase acuosa se cargó con 24 litros de TBME. Esta mezcla se enfrió a continuación a 5 a 10°C, y se ajustó el pH a 2,3 a 2,3 usando 85% de H₃PO₄ -agua (1:4) agitando a la vez intensamente. la temperatura se mantuvo durante este proceso a 5 a 10°C para la estabilidad. Las capas orgánica y acuosa resultantes se separaron. Se guardó la capa orgánica y se extrajo de nuevo la capa acuosa con 24 litros de TBME preenfriado a 5 a 10°C. La capa orgánica resultante se combinó con la capa orgánica guardada y se cargó con diisopropiletilamina (DIPEA) (4,82 kg). La disolución se evaporó a continuación y se desgasificó a una temperatura máxima de 30°C a vacío. El rendimiento fue de 7,84 kg (22,88 mol, 92%) [N-BOC deshidroprolina * DIPEA (BOC-DHP)].

Ejemplo 33**Formación de amida en BOC-DHP**

El BOC-DHP, sintetizado mediante saponificación tal como se describe en el Ejemplo 32, puede contener agua. Por tanto, se aplicó una destilación azeotrópica con tolueno antes de continuar con la reacción. Sin embargo, debido al exceso de reactivos, el cálculo de las materias primas se basó en la cantidad de BOC-DHP antes de eliminar el agua. Para la destilación azeotrópica, se diluyó BOC-DHP con tolueno a una disolución aproximada del 30%. Se eliminó el tolueno a vacío a 40°C. El BOC-DHP tratado (6,00 kg) se disolvió a continuación en THF (48,0 litros). La disolución se cargó con DIPEA (2,26 kg) y la mezcla de reacción se enfrió a -20 a -25°C. A continuación se añadió lentamente cloruro de mesilo (3,01 kg). Durante esta adición precipita clorhidrato de DIPEA. A continuación se agitó la suspensión resultante durante 2 horas a -20°C seguido por saturación con amoníaco mediante una entrada de gas subsuperficial. Añadiendo a la vez el amoníaco, la reacción se calentó a 0°C. Tras la saturación, la mezcla de reacción se calentó a 20°C y se agitó durante 3 horas. Tras la agitación, la mezcla de reacción se filtró para eliminar el clorhidrato. La torta del filtro se lavó con THF (12 litros) en varias porciones. El filtrado se concentró a vacío a una temperatura máxima de 40°C y a continuación se disolvió en cloruro de metileno (33,33 litros). La disolución se lavó con agua (26,66 litros). Las fases orgánica y acuosa resultantes se separaron y la fase acuosa se extrajo dos veces con cloruro de metileno (20 litros cada una). Las capas orgánicas resultantes se combinaron y concentraron a vacío y se desgasificaron para eliminar cualquier exceso de base de Hunigs. El rendimiento fue de 3,35 kg (15,77 mol, 90%) de ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, (Fórmula IV).

Ejemplo 34**Ciclopropanación del 1-(1,1 dimetiletil)-éster del ácido (SS)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico (Fórmula IV) (Fórmula IV).**

Un primer reactor, Reactor A, se cargó con BOC-DHPA (Fórmula IV) (4 kg) disuelto en cloruro de metileno (18,0 litros) y se mantuvo a 20°C. Un segundo reactor, Reactor B, se cargó con cloruro de metileno (18,00 litros) y se enfrió a -30°C. El Reactor B se cargó a continuación con dimetoxi etano (DME) (3,36 kg), seguido por una disolución al 30% de dietil cinc (15,36 kg) en tolueno, manteniendo a la vez la temperatura entre -30 y 25°C. A continuación se cargó el Reactor B con diyodo metano (19,99 kg) manteniendo a la vez la temperatura de reacción entre -30 y -25°C. Tras la adición completa del diyodo metano, la mezcla se agitó durante 45 minutos a -30 a -25°C. A continuación se cargó esta mezcla en el Reactor A mediante una tubería enfriada (-20 a -25°C). Se llevó a cargo lentamente la carga en porciones de aproximadamente 5% de tal manera que la temperatura de reacción del Reactor A se mantuvo entre 22 y 24°C hasta que se completó la reacción. Tras finalizar la reacción, la mezcla del Reactor A se enfrió a 5 a 10°C. A continuación se cargó lentamente la mezcla de reacción con disolución saturada de bicarbonato (21,6 litros) de manera que la temperatura de reacción no excediera de 15°C. Tras esta adición, la mezcla de reacción se agitó durante al menos una hora a la vez que se formó un precipitado. Se filtró la suspensión. La torta del filtro resultante se transfirió posteriormente al recipiente. Se suspendió de nuevo con cloruro de metileno (14,4 litros) durante 30 minutos; y se volvió a filtrar. Tras esta segunda filtración, la torta del filtro se lavó con adición de cloruro de metileno (7,2 litros) A continuación se separaron los filtrados en sus fases acuosa y orgánica y se lavó la fase orgánica con salmuera semisaturada. A continuación se eliminó el disolvente mediante vacío a una temperatura máxima de 30°C y se intercambió por heptano. Se obtuvo una suspensión de producto bruto en heptano. El volumen final de la suspensión después del intercambio del disolvente fue de 14,4 litros. El producto bruto se aisló mediante filtración. La torta del filtro se lavó con heptano (2,9 litros) y a continuación se secó a vacío hasta un peso constante. El rendimiento bruto fue de 2,76 kg (12,2 mol, 72%) de 1,1-dimetiletil éster del ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil]-2-azabicyclo [3.1.0]hexano-2-carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula H). Para purificar, el material bruto se suspendió en una cantidad de 8 veces de una mezcla 1:1 de acetato de butilo/heptano a 20 a 22°C durante 4 horas. El material se filtró y

la torta del filtro se lavó con una cantidad aproximada de 1 vez de heptano. El rendimiento fue de 2,11 kg (9,33 mol, 55%) de 1,1-dimetiletil éster del ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula H).

Ejemplo 35

5 Desprotección del 1,1-dimetil éster del ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H) para formar (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Formula J)

Un matraz de 2 bocas de 100 ml equipado con un agitador mecánico y un termopar se cargó con 1,1-dimetiletil éster [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H)(5,0 gramos, (Fórmula H)(5,0 gramos, 22,1 mmol) y THF (20 ml). HCl (2.5 M en EtOAc, 25 ml 62.5 mmol) se añadió a continuación a la suspensión. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas durante las cuales se observó precipitación. La finalización de la reacción se realizó seguimiento de mediante HPLC. Se añadió metil t-butil éter (MTBE) (30 ml) a la suspensión y se continuó la agitación durante 30 minutos más. A continuación se filtró la suspensión con protección de N₂ para producir un sólido de color blanco que se lavó con MTBE (20 ml). El sólido se secó en un horno a presión reducida durante 48 horas para dar como resultado la sal de clorhidrato de la (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J; 3,6 gramos 100%).

Ejemplo 35A

Preparación alternativa del 1-(1,1-dimetiletil)éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, (Fórmula IV).

20 A. Conversión del ácido 1-(1,1-dimetiletil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico,

A una suspensión de 10,4 g (25,86 mmol) de sal de dicitlohexilamina sólida (DCHA) en una mezcla de 30 ml de agua, se añadieron 40 ml de tolueno y 10 ml de MTBE a 2,7 ml de una disolución acuosa de NaOH 10 N (27 mmol) (el exceso de NaOH debe limitarse a 1,05 eq. o menos). Tras agitar, apareció una mezcla bifásica con capas transparentes y todas las fases sólidas disueltas se dividieron. Se extrajo la fracción orgánica que contenía la sal de sodio del ácido 1-81,1-dimetiletil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico con 4 ml de agua que se añadió a la fase acuosa inicial. La cuantificación mediante HPLC proporcionó 12,55% (p/p) de contenido de "ácido exento de olefina" en la fase acuosa o una recuperación del 96%.

B. generación de DMT-MM

A una disolución de 2-Cl-4,6-diMeO-1,3,5-triazeno (CDMT) (6,2 mg, 35 mmol; 1.5 eq.) en 70 ml de EtOAc mantenida en un baño de agua a temperatura ambiente se añadieron 4 ml (36,38 mmol) de N-metilmorfolina pura (MM). El cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM) sólido comenzó a precipitar. La suspensión que contenía DMT-MM se agitó durante 30 min a temperatura ambiente momento en el que se volvió una pasta espesa. La temperatura aumentó desde 23 a 28-29°C durante la reacción. La temperatura de la reacción se mantuvo por debajo para minimizar la competencia de la desmetilación para formar di-MeO-N morfolino-triazeno (DMMT).

35 C. Conversión de la sal de sodio del ácido 1-(1,1-dimetiletil) -4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico en 1-(1,1-dimetiletil)éster IV del ácido (5S)- 5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico

A una disolución de la sal de sodio de la parte A con equivalente en sal sódica de 5 g (23,5 mmol) de ácido exento de olefina según cuantificación mediante HPLC (V=25 ml) se añadió NH₄Cl sólido (3,75 g, 70 mmol, 3 eq.) momento en el que el pH disminuyó de 14 a 8,9. A esta disolución se añadió suficiente NaH₂PO₄·xH₂O para ajustar el pH a pH=6,20. Nota: la cantidad de fosfato puede variar dependiendo del exceso inicial de NaOH usado para convertir la sal de DCHA en la sal de Na. La disolución tamponada de sal de sodio se transformó en una suspensión de DMT-MM preparada como anteriormente en la parte B.

La mezcla bifásica se agitó a ta durante 4h momento en el que la emulsión inicial se convirtió en una suspensión y precipitó algo de DHMT. Según el HPLC, la reacción se había completado y en ninguna de las fases aparecía ni el éster de DMT activado ni el ácido.

En las condiciones de reacción, un 12-15% en peso de 4,6-diMeO-1,3,5-triazeno éter (DMT-éter) también se formó a través de una reacción entre DMT-MM y DMHT. La suspensión se filtró para eliminar 4,6-diMeO-1,3,5-triazeno (DMHT) y se dividieron las fases. La fase orgánica rica se lavó con disolución acuosa de NaH₂PO₄·xH₂O (2x25 ml) 2N o hasta un pH (aq.)<6 que implicó que la mayoría de N-metilmorfolina se eliminó de la fase orgánica. Las fases se dividieron y la fase rica orgánica se lavó con 25 ml de salmuera.

Normalmente, el rendimiento de la disolución del compuesto del título IV es de 87-90%. ácido con olefina de partida al 1-0% sin reaccionar. La fase rica orgánica se rotoevaporó y se secó de manera azeotrópica con EtOAc reciente (2x250 ml). El material cristalizó parcialmente. La mezcla se disolvió en 8 ml de EtOAc caliente y se mezcló con 10 ml de n-heptano. Comenzó a formarse un sólido inicial. La suspensión se agitó a 50°C durante 30 min y se añadieron 10 ml

más de n-heptano. La suspensión se agitó durante 30 min a temperatura ambiente tras haberse retirado del baño termostático y cada 30 min se realizaron dos cargas adicionales de heptano y la suspensión se agitó durante la noche hasta la completa cristalización. El sólido se filtró y se secó. El rendimiento de la cristalización normal está cercano al 90%. La potencia del compuesto del título VI es del 90% y se tiene en cuenta el DMT-éter para el 10% en peso restante.

El sólido formado se encontró que era un co-cristal verdadero del compuesto del título IV y DMT-éter que proporcionó un único pf agudo de 97,4°C en comparación con el pf de la amida de 89,7°C según la DSC. La forma del co-cristal es más cristalina y se retira más fácilmente de la disolución.

Ejemplo 35B

Preparación de la sal de dicitclohexilamina del ácido 1-(1,1-dimetiletil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico

A. Preparación de la sal de sodio del ácido 1-(1,1-dimetiletil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico,

Se añadieron 3 volúmenes de etanol a una disolución de tolueno del ácido 1-(1,1-dimetiletil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, (aproximadamente 15 % en peso a 25 % en peso) (1g/ml). La disolución se enfrió a 0-5°C. Se añadió lentamente a la disolución una disolución 5N de NaOH-agua (2 equivalentes) manteniendo a la vez la temperatura <5°C (ligeramente exotérmica). La mezcla de reacción se calentó a 20-25°C y se agitó hasta que se completó la reacción,

Se añadieron a la mezcla de reacción 4 volúmenes de agua y la mezcla de reacción se destiló a vacío (temperatura del baño. 40°C) para eliminar el etanol. Se añadieron al residuo 0,5 volúmenes de tolueno (0,865 g/ml) y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se formaron las capas acuosa y orgánica. La capa acuosa que contenía la sal de sodio se separó y usó en la parte B.

B. Preparación de la sal de dicitclohexilamina del ácido 1-(1,1-dimetil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico

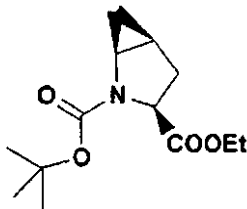
Se añadió un volumen de MTBE (0,74g/ml) a una disolución acuosa de sal de sodio del ácido 1-(1,1-dimetiletil) 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico. Se añadieron 0,2 volúmenes de heptano (0,684 g/ml) a la anterior disolución y la disolución resultante se enfrió a 0-5°C. Se añadió lentamente a la disolución 85% de H₃PO₄ (1 g/ml) para llevar el pH a 2,5-3 manteniendo a la vez la temperatura <5°C (ligeramente exotérmica). Se separaron las capas resultantes y se añadió a la capa orgánica que contenía el producto 1 volumen de salmuera al 75%. La mezcla se agitó durante 10 minutos y se separaron las capas resultantes. El producto estaba contenido en la capa orgánica.

Se enfrió la disolución orgánica a 0-5°C y se añadió dicitclohexilamina (0,91g/ml) lentamente (ligeramente exotérmica) manteniendo a la vez la temperatura <10°C. La mezcla de reacción se agitó a 0-5°C durante 3 horas. Los sólidos se filtraron y lavaron con 0,5 volúmenes de 1:1 MTBE/heptano la sal de DCHA resultante (1 g/ml) se secó y recuperó.

Ejemplo 35C

Preparación alternativa del 1,1-dimetiletil etil éster del ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H) (denominado también sin-N-BOC-4,5-metanoprolina)

A. Preparación del éster etílico de (s)-BOC-4,5-metanoprolina



Se cargó un matraz de 3 bocas seco a la llama (agitación magnética) con 2,2 g del 1-(1,1-dimetiletil),5-etil éster del ácido 4,5 dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, (2,20 g 9,12 mmoles, 1 eq) y 22 ml de tolueno seco. La disolución resultante se enfrió a -30° y se cargó además gota a gota con 16,58 ml (18,24 mmoles) de dietil cinc (disolución 1.1 M en tolueno).

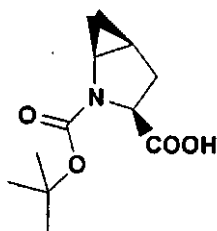
Una disolución de 2,66 ml (6,43 g, 36,47 mmoles) de cloro yodometano en 2.2 ml de tolueno se añadió gota a gota manteniendo a la vez la temperatura de reacción entre -25°C y -30°C. La reacción se mantuvo a -20°C durante 16 h. A continuación la reacción se inactivó rápidamente con 22 ml de disolución semisaturada de bicarbonato y se calentó a temperatura ambiente. Se formó un precipitado de color blanco que se eliminó mediante filtración sobre Hyflow (filtro auxiliar) y se lavó con tolueno (ca 10 ml). Se separó la capa orgánica del filtrado bifásico y se lavó dos veces con agua (11 ml en cada vez). La capa orgánica se evaporó hasta sequedad para dar un aceite amarillento (2,33 g) que fue el etil éster de N-BOC-metanoprolina (mezcla de isómeros sin-y anti-(8:1).

El anterior procedimiento se usó para preparar grandes cantidades de la mezcla anterior de isómeros suficientes para su uso en la siguiente etapa. A 20-25°C, 3,40 kg del éster etílico de N-BOC 4,5-metanoprolina (mezcla de isómeros sin-y anti) se agitaron intensamente con 5,17 kg (66,59 g/mol) 40,0% de metil amina (disolución en agua) en una atmósfera de nitrógeno.

- 5 Después de completarse la reacción, la mezcla se diluyó con 5,17 l de agua y 5,17 l de MTBE y se agitó durante otros 5 minutos antes de que se produjera la división de fases. La capa orgánica se lavó con 5,17 l de agua. Se evaporó la capa orgánica resultante (vacío, T_{máx} 40°C) hasta peso constante.

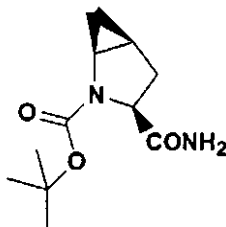
Se obtuvo un rendimiento de 2,52 kg de etil éster sin-N-4,5-metanoprolina (9,85 mol, 74%)

B. Preparación de s-BOC-4,5-metanoprolina



- 10 Se preparó una disolución de 2,57 kg de etil éster de sin-N-BOC 4,5-metanoprolina (s-BOC-MPEE) en 10,28 l de etanol. Se añadió a esta disolución a 20-28°C una disolución preparada de 0,51 kg hidróxido de litio hidratado en 5,07 l de agua. Se llevó a cabo la reacción con protección de gas inerte (nitrógeno). La mezcla de reacción se agitó durante 14 h a 20-25°C (IPC). Tras completarse la reacción, la mezcla se evaporó a 40°C (vacío). El aceite resultante se capturó en 25,70 l de agua y 25,70 l de MTBE y se agitó durante 30 min. Se separó la fase orgánica y se extrajo de nuevo la capa acuosa con 12,85 l de MTBE. Se añadieron a la fase acuosa 25,70 l de MTBE y se ajustó el pH de la mezcla a pH 2 mediante la adición de HCl 1N (ca. 12 l). La capa orgánica separada y la fase acuosa se volvieron a extraer con 12,85 l de MTBE. Las capas orgánicas combinadas procedentes de la etapa anterior se evaporaron hasta sequedad para dar como resultado 1,88 kg de sin-N-BOC 4,5-metanoprolina (8,25 % en moles, 82%).

- 15 **C. Preparación del 1,1-dimetiletil éster del ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo [3.1.0]hexano-2-carboxílico,**



- 25 Se disolvieron 2,00 kg de sin-N-BOC-4,5-metanoprolina en 40,00 l de THF y se enfriaron a -15°C. Se añadió a esta mezcla 1,07 kg de N-metil morfolina (P0). A la mezcla de reacción se cargaron 1,32 kg de clorofornio de isobutilo de manera que la temperatura de reacción no excediera de -8°C. Tras la adición completa, la mezcla se agitó durante 30 min a -10°C (P1, IPC 1). Clorhidrato de N-Metil morfolina precipita a partir de la mezcla de reacción.

- La mezcla de reacción se calentó a -5°C y se purgó a continuación mediante un tubo de entrada de gas con amoníaco (0,79 kg, teor, 5,00 eq). A continuación la mezcla de reacción se calentó a 20-25°C y se agitó a esta temperatura durante 4 h (P2, IPC 2). Se añadieron a la mezcla de reacción 40,00 l de salmuera saturada. A continuación el pH de la mezcla se ajustó a pH 4 a 4,5 mediante adición de una disolución saturada de bisulfato de potasio. A continuación se separó la capa orgánica y se extrajo de nuevo la fase acuosa con 20,00 l de MTBE. Las capas orgánicas separadas se evaporaron hasta sequedad. El producto bruto se disolvió en 8,00 l de acetato de butilo a temperatura de reflujo. El producto precipita a ca de 30°C. Al inicio de la cristalización la mezcla se trató lentamente con 20,00 l de heptano y se agitó adicionalmente durante otras 2 h. Se aisló el producto mediante filtración. La torta del filtro se lavó con dos porciones de acetato de butilo/heptano frío (1:4) 1,61 cada una, y dos veces con 2,00 l de heptano, cada una y se secó a 30-35°C (vacío) para dar como resultado 1,64 kg (7,22 mol, 82%) de sin-N-BOC 4,5-metanoprolina amida (s-BOC-MPA).

Ejemplo 36

Protección con BOC del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}] decano-1-acético (Fórmula V) para formar el ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi) carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, VI.

Ácido de Fórmula VI

- 5 El ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) (469 gramos, 2,08 moles) se disolvió en NaOH 1 N enfriada en hielo (5 litros, 5 moles, 2,4 equivalentes) en un divisor de fases equipado con una sonda de temperatura y una sonda de pH. Se añadió THF (2,5 litros) a la disolución. A continuación se añadió Boc₂O sólido y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. A continuación se añadió EtOAc (4 litros) con agitación y las capas acuosa y orgánica resultantes se separaron. Se ajustó el pH de la capa acuosa a 7 con HCl concentrado. A continuación se añadió EtOAc (4 litros) y se añadió más HCl hasta disminuir el pH a aproximadamente 1. El volumen total del HCl concentrado añadido fue de 510 ml. Las capas orgánica y acuosa se separaron de nuevo y se extrajo la capa acuosa con EtOAc (3 x 3 litros). A continuación se combinaron y lavaron las capas orgánicas con agua (3 litros) y salmuera (3 litros). A continuación se secó la capa orgánica lavada con Na₂SO₄ y se concentró en un rotavapor a temperatura ambiente hasta sequedad. El rendimiento fue de 542 gramos de ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI).

Ejemplo 37

Reacción de acoplamiento para producir el 1,1-dimetiletil éster del ácido 3 ciano-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula K).

- 20 Se cargó un matraz de 2 litros con tres bocas equipado con un termómetro, un agitador mecánico y una entrada de gas con ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) (50 gramos, 153,8 mmol). Se añadió THF (200 ml) y se agitó para producir una disolución transparente. La disolución se enfrió a -6°C en un baño de agua con hielo seco con acetona. A continuación se añadió cloruro de metanosulfonilo (Mes-Cl) (13,1 ml, 169 mmol, 1,1 equivalentes como una única porción seguido por diisopropiletilamina (94 ml, 539 mmol, 1,1 equivalentes). La diisopropiletilamina se añadió lentamente durante un periodo de aproximadamente 4 minutos para mantener la temperatura interna por debajo de 8°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C hasta que todo el ácido se convirtió a un anhídrido mixto. Sal de clorhidrato de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (32,5 gramos, 200 mmol, 1,1 equivalentes) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (1,04 gramos, 7,6 mmol, 0,05 equivalentes) se añadieron a continuación en una única porción y se retiró el matraz del baño de enfriamiento. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se dejó durante la noche a temperatura ambiente.

Ejemplo 38

Protección con BOC del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}] decano-1-acético (Fórmula V) para formar el ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi) carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VIA).

35 Fórmula VIA (sal DABCO)

- 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) (15g; 125,1 mmoles) se cargó en una disolución de ca. 30 g (135 mmoles) del ácido de la Fórmula VI del Ejemplo 36 en 300 ml de acetato de isopropilo. Se cargó acetato de etilo (150 ml) en la mezcla de reacción anterior (relación volumétrica de acetato de etilo: acetato de isopropilo (150 ml/300 ml)). La mezcla de reacción se sembró con la sal DABCO de la Fórmula VI (200 mg). La mezcla de reacción se agitó intensamente a temperatura ambiente. Se introdujo agua (5 ml) lentamente en la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se agitó intensamente a temperatura ambiente para inducir la formación de cristales tras 15-20 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente y el producto de reacción se filtró en un embudo Buchner. Los sólidos se lavaron con acetato de etilo a temperatura ambiente y se secaron a 50°C a vacío para dar 47g (79%) de la sal DABCO de la Fórmula VIA.

45 Ejemplo 39

Reacción de acoplamiento para producir el 1,1-dimetiletil éster del ácido 3 ciano-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula K).

- 50 Se cargó un matraz de 250 litros con tres bocas equipado con un termómetro, un agitador mecánico y una entrada de gas con la sal de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano del ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VIA) (5 gramos, 11,44 mmol) preparada en el Ejemplo 38. Se añadió THF (25 ml) y se agitó para producir una suspensión. La suspensión se enfrió a 0°C en un baño de agua con hielo. A continuación se añadió cloruro de metanosulfonilo (Mes-Cl) (1,15 ml, 14,85 mmol, 1,3 equivalentes como una única porción seguido por diisopropiletilamina (94 ml, 40 mmol, 3,5 equivalentes). La diisopropiletilamina se añadió lentamente durante un periodo de aproximadamente 4 minutos para mantener la temperatura interna por debajo de

5°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 10 minutos hasta que todo el ácido se convirtió a un anhídrido mixto. Se añadieron a continuación sal de clorhidrato de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (2,42 gramos, 14,9 mmol, 1,3 equivalentes) e hidroxibenzotriazol (HOBT) (77 mg, 0,57 mmol, 0,05 equivalentes) en una única porción y se retiró el matraz del baño de enfriamiento. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se dejó durante la noche a temperatura ambiente.

Ejemplo 40

Deshidratación e hidrólisis para producir 1,1-dimetil éster del ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1³⁷]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula L).

Se añadió piridina (6 equivalentes, 922 mmol, 74,6 ml) a la mezcla de reacción del Ejemplo 39 y se enfrió la mezcla de reacción en un baño de enfriamiento a -8°C. A continuación se añadió anhídrido trifluoroacético (TFAA) (4 equivalentes, 616 mmol, 87 ml) lentamente durante 6 minutos manteniendo a la vez la temperatura por debajo 10°C. La reacción se agitó a 24°C durante 0,5 h y se comprobó mediante HPLC (30 ml, 0,5 ml de AcN, 0,5 ml de H₂O) para la desaparición del compuesto K del Ejemplo 37.

A continuación se enfrió la reacción en un baño de enfriamiento a aproximadamente -3°C. Se añadió NaOH (5 N, 6 equivalentes, 0,925 mol, 185 ml) a la reacción durante 10 minutos (disolución acuosa pH = 9,9) manteniendo a la vez la temperatura de reacción 10°C. Se añadió una disolución acuosa de K₂CO₃ (319 gramos, 15 equivalentes, disuelto en 510 ml de H₂O) durante 5 minutos (temperatura = 8°C, disolución acuosa. pH 11,1). La reacción se dejó avanzar durante 7 horas 40 minutos. La reacción se completó cuando se hidrolizaron todos los intermedios hasta el penúltimo según se determinó mediante HPLC (30 μ l. 0,5 ml de AcN, 0,5 ml de H₂O).

Se añadió a continuación EtOAc (500 ml) a la mezcla de reacción y se separaron las capas acuosa y orgánica resultantes. La capa orgánica se lavó con 500 ml de disolución tampón (H₃PO₄ 2M NaH₂PO₄ 1M). La temperatura aumentó a 23°C desde 15°C. Tiempo de adición: 5 min. Disolución acuosa. V = 560 ml pH = 4,5, 32 mg de producto mediante HPLC; V org = 1.080 ml. La fase orgánica se lavó con 500 ml de una segunda disolución tampón; Disolución acuosa. V = 780 ml, pH = 2,5, 415 mg de producto mediante HPLC; V orgánica = 800 ml. 1,02% en v/v de piridina. La capa orgánica se lavó con 300 ml de salmuera. Disolución acuosa. V = 350 ml, pH = 1,8, 20 mg producidos mediante HPLC; La capa orgánica se lavó con 130 ml de disolución saturada de NaHCO₃; Disolución acuosa. V = 176 ml, pH = 6,0, 780 mg de producto La capa orgánica se lavó con 300 ml de salmuera semisaturada Disolución acuosa. V = 330 ml, pH = 5,2, 25 mg de producto. V orgánica = 650 ml. piridina 0,045% en v/v. Se añadieron 5 g de Darco a la capa orgánica y se agitaron durante 5 min, se filtraron a través de 50 g de sílice, se lavaron con 4 x 25 ml de EtOAc, V orgánica = 750 ml. piridina 0,04% en v/v.

La capa orgánica se eliminó a continuación mediante destilación hasta aproximadamente 133 ml. La capa orgánica se agitó durante 1 hora hasta que la disolución volvió a ser turbia. Se añadieron 133 ml de heptano durante 15 min y la suspensión se agitó durante la noche. Se añadieron 133 ml de heptano durante la noche. La mezcla se agitó intensamente durante 20 minutos con agitación mecánica. Los sólidos se eliminaron mediante filtración y se lavó la torta con 50 ml de EtOAc/heptano al 5%; se encontraron 3,4 g de producto en 8,86 g de producto bruto tras la eliminación de los disolventes a partir del licor madre. Los cristales de producto seco se calentaron a 50°C a vacío durante la noche. se obtuvieron 467 g de producto ~73%, 96,6 AP

Ejemplo 41

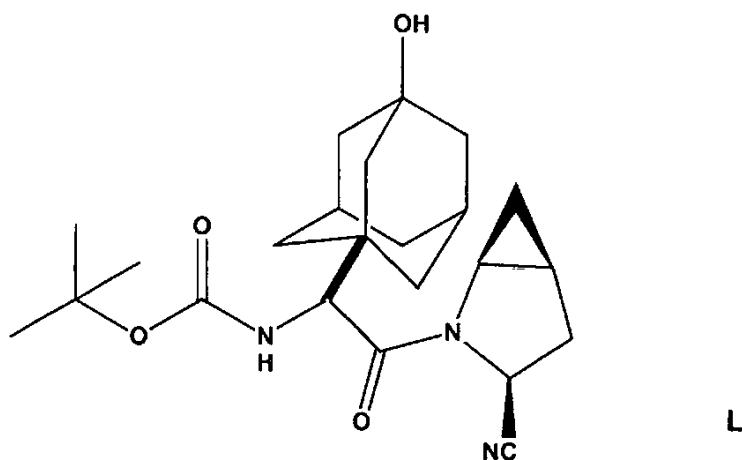
Desprotección para producir benzoato (1:1) de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1³⁷]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, (Fórmula M)

Se introdujo 1,1-dimetil éster del ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1³⁷]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, (Fórmula L) (5,0 gramos, 12,04 mmoles) en un matraz de tres bocas equipado con un termómetro, un agitador mecánico, y una entrada de gas. Se añadió EtOAc, aproximadamente 45 a 50 ml, hasta conseguir una disolución transparente. Se añadió HCl concentrado (3,00 ml 37% en p/p, 36,14 mmoles, 3 equivalentes) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó hasta que se produjo un sólido. A continuación se añadió agua (30 ml) y se agitó la mezcla durante 1 a 2 minutos. Esta mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se dejó que se separaran las capas de la mezcla de reacción en una división de fases limpia. La capa acuosa se ajustó a un pH más bajo de aproximadamente 6 con NaOH al 25%, manteniendo a la vez la temperatura por debajo de 25°C.

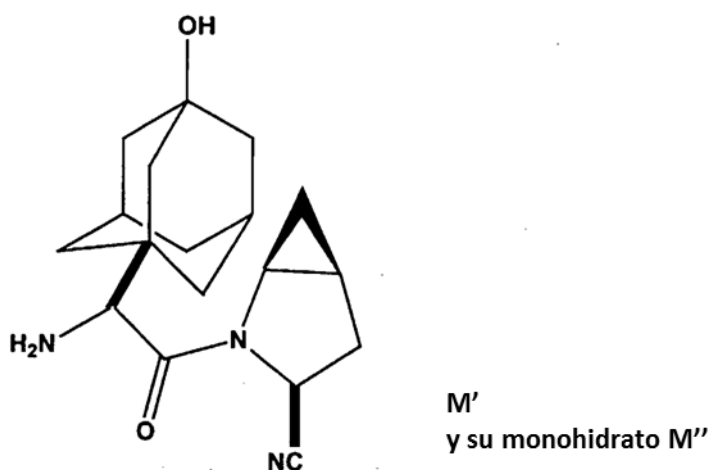
A continuación se llevó a cabo el intercambio de sales mediante la adición de alcohol isopropílico (IPA; 2 a 3 ml) a la capa acuosa seguido por la adición de benzoato de sodio (0,65 ml de una disolución de benzoato de sodio preparada disolviendo 2,6 gramos de benzoato de sodio en 6,5 ml de agua). A continuación se añadió la disolución de benzoato de sodio restante de una manera gota a gota mediante un embudo de adición. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas, A continuación se filtraron los sólidos en la mezcla de reacción en un embudo Buchner y se lavaron con agua hasta que el sólido dio un ensayo negativo para Cl con AgNO₃. A continuación se lavaron los sólidos con heptano (10 ml) para eliminar el agua, secar al aire en el embudo, y secar en un horno de vacío a 35°C hasta que KF $\leq$ 5%. El rendimiento fue del 79%. 4,1 gramos

Ejemplo 42

Desprotección de L



para producir la base M' libre

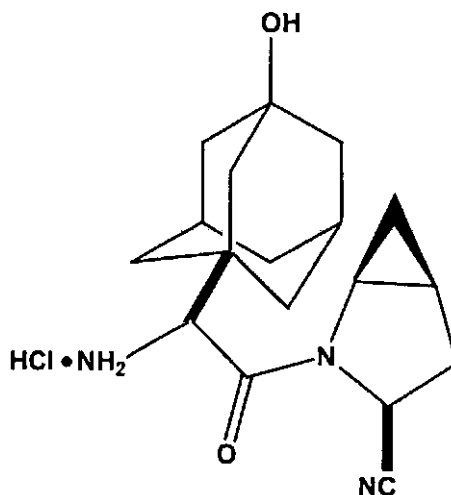


5

10

El compuesto (L) del Ejemplo 38 (300 g 0,723 mol, potencia del 90,6%), cloruro de metileno (3l), metanol (288 ml 7,23 mol) y ácido clorhídrico concentrado (36%) (288 ml, 7,23 mol) se introdujeron en un matraz de 12 l de 3 bocas equipado con agitador mecánico, sonda de temperatura y entrada de gas. La reacción se produjo manteniendo a la vez la temperatura de reacción en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 25°C. La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas, se dividió en 2 fases y se recogió la capa acuosa superior. Se añadió a la capa acuosa cloruro de metileno (6 l), y agua (720 ml), y se añadió gota a gota NaOH 5N (~600 ml) para ajustar el pH a 9,0 -10,5.

Se trató la fase orgánica que contenía la sal de clorhidrato



(identificada mediante HPLC) (Fórmula L') con cloruro de metileno (6 l) y agua (720 ml), y se añadió gota a gota una disolución de hidróxido de sodio 5N (-600 ml) manteniendo a la vez la temperatura de reacción entre 20 y 25°C para
5 ajustar el pH entre 9 y 10,5. se añadió NaCl (120g) y se agitó la mezcla durante 20 min para formar una división de fases. Se recogió la capa orgánica (6,2 l) (que contenía 174g del compuesto M') y se descartó la fase acuosa (1,75 l) (que contenía 6,5 g de compuesto M').

Se lavó la capa orgánica con disolución de salmuera de NH₄Cl al 1% (450 ml) (la disolución de salmuera de NH₄Cl al 1% contenía 1 g de NH₄Cl, 25g de NaCl y 74 g de H₂O). A partir de la división de la fase resultante se recuperaron 6,0
10 l de la capa orgánica (que contenían 176 g de compuesto M' en disolución) y se descartó la capa acuosa (0,45 l) que contenía 1,4 g del compuesto M' (-0,4%).

Se añadió acetato de etilo (-4L) a la capa orgánica a la vez que se eliminaba mediante destilación el CH₂Cl₂ a 25°C/50 mm de Hg. Se suspendió la destilación cuando se alcanzó un volumen final de 2,5 l. Se afinó la capa orgánica mediante filtración para eliminar el NaCl sólido y se concentró hasta -1 kg (-170 g de compuesto M' en 1 l de acetato de
15 etilo) análisis de CG: DCM < 0.1%. Se añadió agua 817 ml) gota a gota y después de 10 min comenzó la cristalización. Se añadieron 17 ml de agua y la suspensión resultante se agitó durante 30 min, se filtró, la torta se lavó con acetato de etilo y se secó a *vacuo* para dar 186 g del compuesto M', rendimiento del 81%.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Bristol-Myers Squibb Company
- <120> Procedimientos y compuestos de producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV e intermedios de los mismos
- 25 <130> LA0084
- <150> 60/431.814
- <151> 12-09-2002
- 30 <160> 5
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- 35 <211> 26
- <212> ADN
- <213> Sintético
- <400> 1
- 40 tcgtcatgaa aatcgttctc gttttg 26
- <210> 2
- <211> 28

ES 2 494 793 T3

<212> ADN
 <213> Sintético
 <400> 2
 tactgttttt ccagcgatt cctaggct 28
 5
 <210>3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sintético
 10
 <400> 3
 gatgctcata tgcgcgacgt gtttgaaatg atg 33
 15
 <210>4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sintético
 20
 <400> 4
 gatcccgggc taaggcgaat taataattcg 30
 25
 <210>5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintético
 <400> 5
 Asn Ser Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Pro Arg Arg Pro Arg Ile Asn Ser
 1 5 10 15
 Pro
 30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un inhibidor de dipeptidil peptidasa IV basado en pirrolidina fusionada a ciclopropilo, que comprende:

- 5 (a) proteger el ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético con BLOC ;
- (b) acoplar el ácido (α S)- α -[[[(1,1-dimetiletoxi)cabonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético o su sal de 1,4-diazabicyclooctano con (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida para producir el 1,1-dimetil éster del ácido
- 10 3-(aminocarbonil)-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico;
- (c) deshidratar el 1,1-dimetil éster del ácido
- 3-(aminocarbonil)-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico para producir el 1,1-dimetil éster del ácido
- 15 3-(ciano)-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, y
- (d) hidrolizar el 1,1-dimetil éster del ácido
- 3-(ciano)-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico para formar el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además reducir asimétricamente el ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético para producir ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético mediante aminación o transaminación.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además sintetizar químicamente el ácido
- 25 (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético a partir de ácido tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida de la etapa (a) se produce mediante eliminación de BOC del 1,1-dimetil éster del ácido
- 30 1S-(1 α ,3 β ,5 α)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el 1,1-dimetil éster del ácido 1S-(1 α ,3 β ,5 α)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico se produce mediante ciclopapanación de del 1,1-dimetil éster del ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, vía una reacción Simmons-Smith.