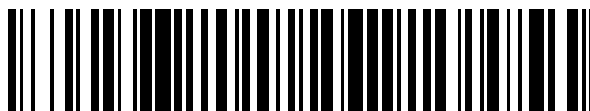


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 138**

51 Int. Cl.:

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 12162633 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2505579**

54 Título: **Métodos 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:
07.01.2015

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)
151 85 Södertälje, SE**

72 Inventor/es:

**VU, TRUC CHI;
KOLOTUCHIN, SERGEI V.;
MAZZULLO, JOHN A., JR.;
WANG, JIANJI;
WONG, KWOK;
YU, JURONG y
ZHU, JASON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 526 138 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

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

CAMPO DE LA INVENCION

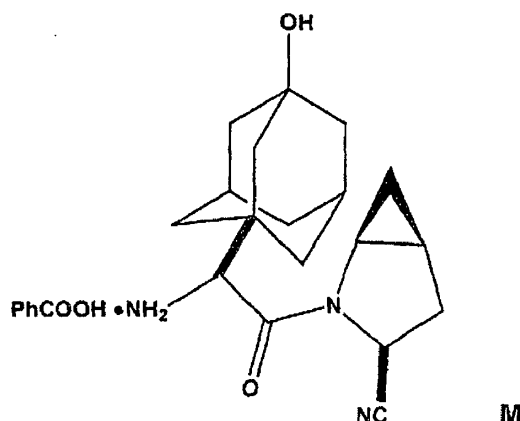
La presente invención proporciona métodos y compuestos para uso en métodos de producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Se proporcionan también métodos para la aminación reductora asimétrica del compuesto intermedio ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

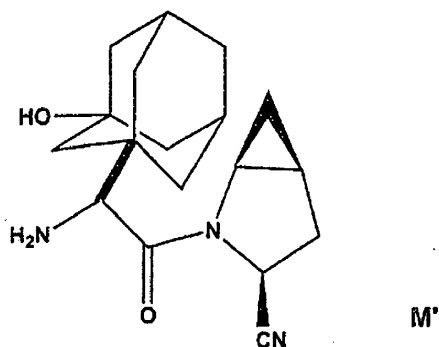
La dipeptidil peptidasa IV es una serina aminopeptidasa no clásica unida a la membrana que se localiza en una variedad de tejidos, incluyendo, pero sin limitarse a, intestino, hígado, pulmón, y riñón. Esta enzima se localiza también en los linfocitos T en circulación, en los que se denomina CD-26. Dipeptidil 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 postraducciona 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 promueve la saciedad y ralentiza 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 para potenciar los niveles endógenos de GLP-1(17-36). La patente de los Estados Unidos nº 6.395.767 describe inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Los métodos para sintetizar químicamente estos inhibidores se describen en la Patente de los Estados Unidos nº 6.395.767, así como en la bibliografía. Por ejemplo, véanse 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 descrito en la Patente U.S. nº 6.395.767 es (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) como se representa en la Fórmula M.



y la base libre correspondiente, (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 M''

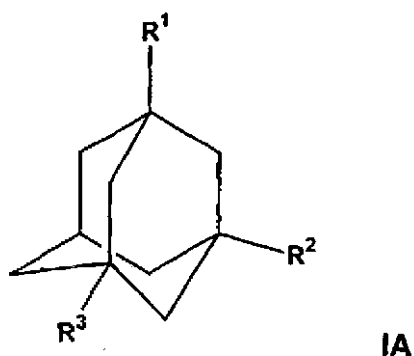
En el documento EP 0 808 824 A2 se describen métodos adaptados para preparar los intermedios usados en la producción de este inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV. Véanse también Imashiro y Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315, Reetz y col. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72, Reetz y Heimbach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

La presente invención proporciona nuevos métodos de producción y compuestos para uso en la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo.

SUMARIO DE LA INVENCION

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

Los intermedios descritos aquí comprenden un compuesto de Fórmula IA:



en la que

R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y OH;

R² se selecciona del grupo que consiste en -C(=O)-COR⁴, -C(=O)NR⁵R⁶, -C(X)_n-COR⁴ y -C-NR⁷R⁸COR⁴, en el que X es un halógeno;

n es de 1-2

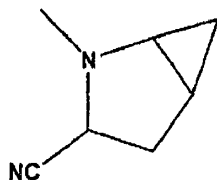
R⁴ se selecciona del grupo que consiste en O-alquilo, NH₂ y OH; y

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

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

R¹¹ es R¹³COOH,

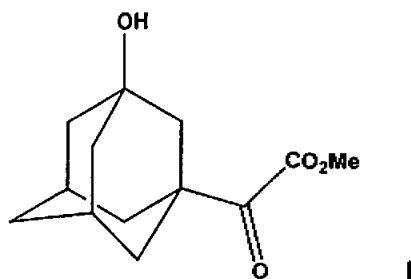
R¹² es



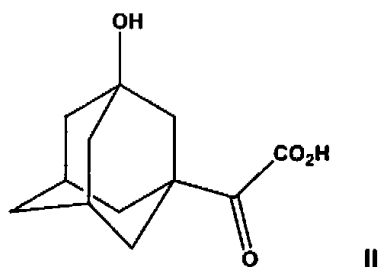
y R¹³ es un alquilo o arilo.

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

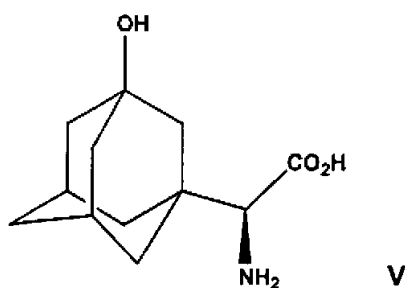
- 5 ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, éster de metilo, como se representa gráficamente en la Fórmula I,



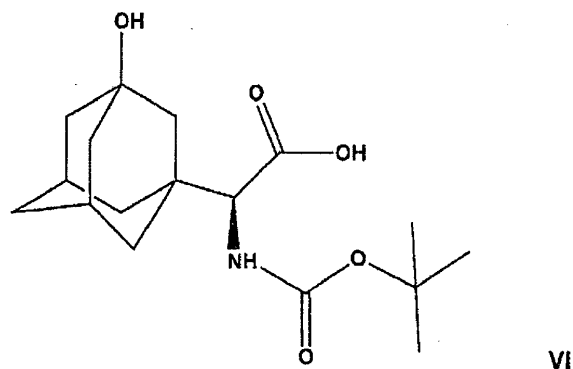
ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como se representa gráficamente en la Fórmula II,



- 10 ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como se representa gráficamente en la Fórmula V,

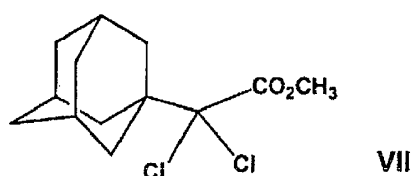


ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como se representa gráficamente en la Fórmula VI,

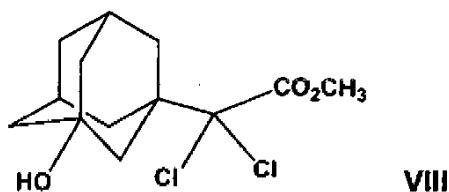


(o su sal de DABCO VIA),

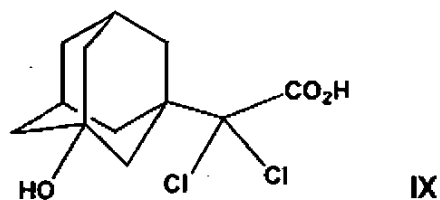
éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético como se representa gráficamente en la Fórmula VII,



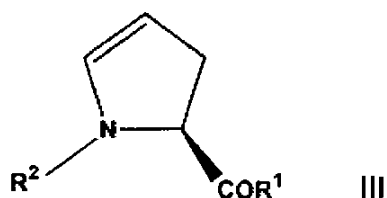
- 5 éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético como se representa gráficamente en la Formula VIII, y



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



- 10 Se describen aquí otros intermedios que comprenden los compuestos ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil),5-etil éster como se representa gráficamente en la Fórmula III,

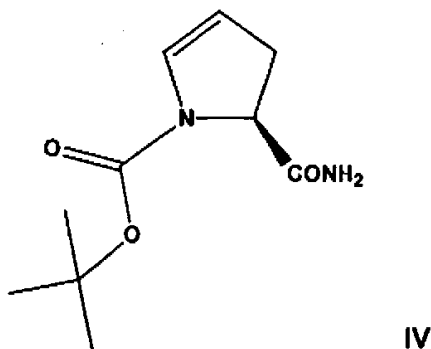


en la que

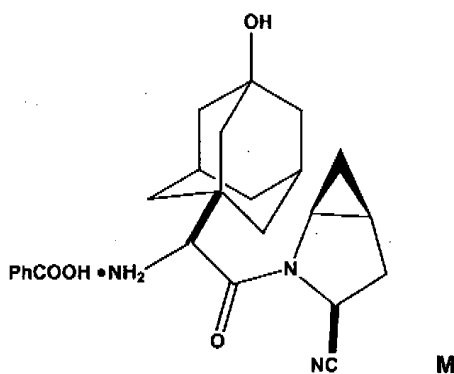
R^1 se selecciona del grupo que consiste en O-alquilo, NH_2 y OH, y

- 15 R^2 se selecciona del grupo que consiste en t-BOC y CBz;

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

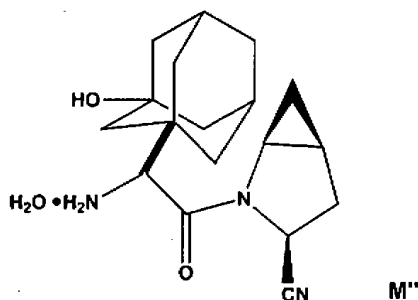


En una realización preferida, estos compuestos se usan como intermedios en la producción de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, benzoato (1:1) como se representa gráficamente en la Fórmula M



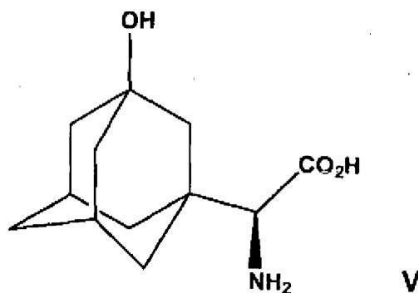
5

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



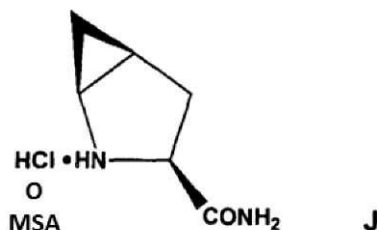
10

Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos para la producción de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo. En una realización preferida, los inhibidores producidos son (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, benzoato (1:1) y su base libre correspondiente tal como se representan en las Fórmulas M y M', respectivamente. Estos inhibidores pueden formarse 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 como se representa gráficamente en la Fórmula V,



15

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



Se describen aquí diversos métodos para la producción y el acoplamiento de estos fragmentos, dependiendo de los compuestos intermedios seleccionados como materiales de partida. Por ejemplo, se describe un método para la producción de un inhibidor a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo a partir de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético tal como se representa gráficamente en la Fórmula II. También se describe un método para la producción del inhibidor a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo a partir de ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula V. En otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción del inhibidor a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo a partir de ácido (α S)- α [[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula VI. También se describe un método para la producción del inhibidor a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo a partir de ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster de Fórmula IV.

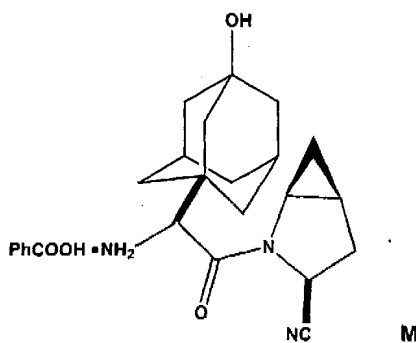
Se describen aquí métodos para la síntesis de intermedios útiles en la producción de inhibidores a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo. Se describe aquí un método para la aminación reductora asimétrica o la transaminación del ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). También se describe un método para la síntesis química de ácido (α S)- α -amino-3-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster (Fórmula IV) a partir de ácido tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N). También se describen métodos para la producción de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a partir de 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 describen métodos 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 un método para la producción de ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster (Fórmula IV) a partir de ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil),5-etil éster (Fórmula III). El ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster (Fórmula IV) puede usarse como un intermedio en la producción del ácido [1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-aminocarbonil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula H).

También se describe 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). La línea celular comprende células que contienen un plásmido que expresa formiato deshidrogenasa y fenilalanina deshidrogenasa. La más preferida es la línea celular de la ATCC con el Número de Acceso PTA-4520.

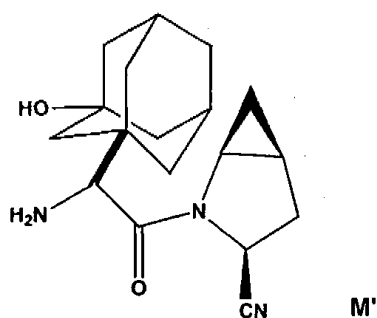
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los compuestos a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo tales como (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) y su base libre correspondiente y monohidrato de la misma son inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV útiles en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones, hiperglucemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidad, y aterosclerosis y enfermedades relacionadas, así como enfermedades inmunomoduladoras y enfermedad inflamatoria crónica del intestino. En la presente invención, se proporcionan nuevos compuestos y métodos para uso en la producción de compuestos a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo tales como (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) y su base libre correspondiente y monohidrato.

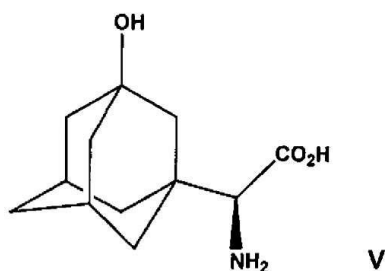
Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV son (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, benzoato (1:1) como se representa gráficamente en la Fórmula M.



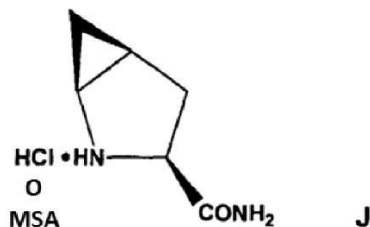
y preferentemente la base libre correspondiente de Fórmula M' representada gráficamente a continuación o su monohidrato M'' expuesto aquí a continuación.



- 5 En la presente invención, se proporciona un método 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 (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como se representa gráficamente en la Fórmula V,



- 10 y la sales ácidas de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida tales como la sal de hidrócloruro o la sal de MSA tal como se representa gráficamente en la Fórmula J.



La presente invención también describe métodos para la producción de estos fragmentos, así como compuestos intermedios útiles en la producción de estos fragmentos.

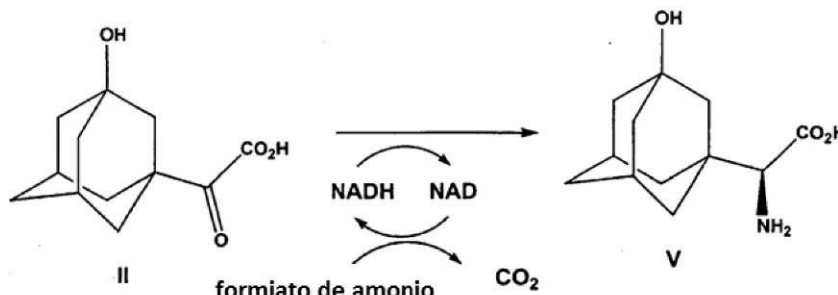
- 15 Se describen métodos para la producción del fragmento de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) mediante aminación reductora o transaminación del compuesto intermedio ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). En una realización preferida de este método, el 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
- 20 usando una fenilalanina deshidrogenasa u otras aminoácido deshidrogenasas activas con cetoácidos. Las fenilalanina deshidrogenasas ilustrativas útiles en la presente invención incluyen las de la especie *Sporosarcina* o una fenilalanina

deshidrogenasa de la especie *Thermoactinomyces*, 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*. La construcción y crecimiento de cepas recombinantes de *E. coli* y *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 también induce la producción de formiato deshidrogenasa (Hanson y col. (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358).

Células de *E. coli* que contienen un plásmido que expresa la formiato deshidrogenasa de *Pichia pastoris* (ATCC 20864) y una versión modificada del gen de fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces intermedius* (ATCC 33205) se depositaron y aceptaron por un Organismo Internacional de Depósito según lo estipulado por el Tratado de Budapest. El depósito se realizó 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 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 una depositaria pública 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-α-oxotriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se representa gráficamente en el siguiente Esquema I.

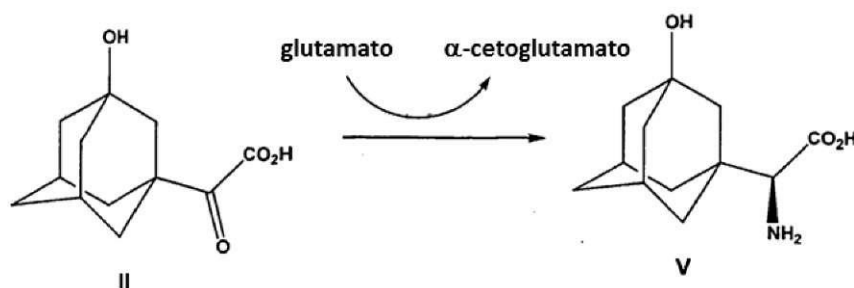
ESQUEMA I



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

Se puede lograr también la misma conversión usando una transaminasa tal como se muestra en el Esquema II:

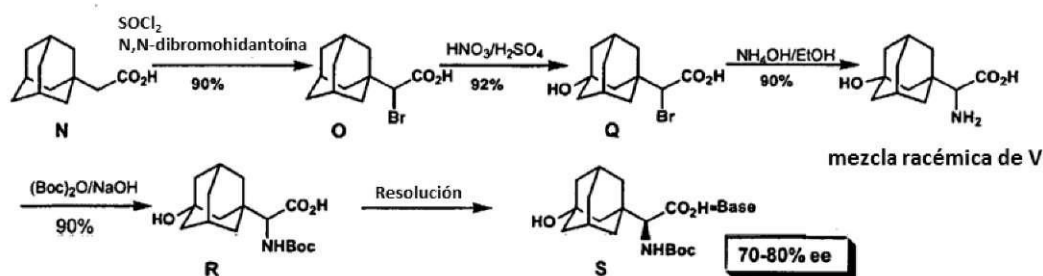
ESQUEMA II



Tal 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 aquí.

También se puede sintetizar químicamente el ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). Un método ilustrativo para la síntesis química del ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se representa gráficamente en el Esquema III:

ESQUEMA III



Tal 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 a partir del ácido tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) bromando en primer lugar el ácido tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético en ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O). En esta bromación, el material de partida, ácido tricyclo[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 la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La finalización de la reacción se verificó mediante cromatografía de gases. Se añadió a continuación en porciones anhídrido N-bromosuccínico sólido (NBS) a la mezcla de reacción, y la mezcla de reacción se calentó hasta 60°C. La temperatura se mantuvo entre 60 y 65°C, a la vez que la reacción se agitó 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 la capa orgánica se lavó con agua. Tras lavar, se añadió agua adicional a la capa de heptano, y el heptano se eliminó mediante destilación. A continuación se añadió tetrahidrofurano (THF) a la capa acuosa que queda, 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 mientras 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 varias 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 aquí.

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, el ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) se preparó a partir de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) cargando en primer lugar un matraz Erlenmeyer con H₂SO₄. A continuación, el matraz se enfrió en un baño de hielo y se añadió HNO₃ al 50% al matraz. A continuación, el ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) sólido se añadió a la mezcla en porciones, manteniendo la temperatura por debajo de 28°C. A continuación, la reacción se calentó hasta 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 paralizar 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 aquí.

A continuación, el ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) se disolvió en hidróxido amónico, preferentemente hidróxido amónico al 30%, y la mezcla de reacción se calentó preferiblemente hasta 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 producir 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 aquí.

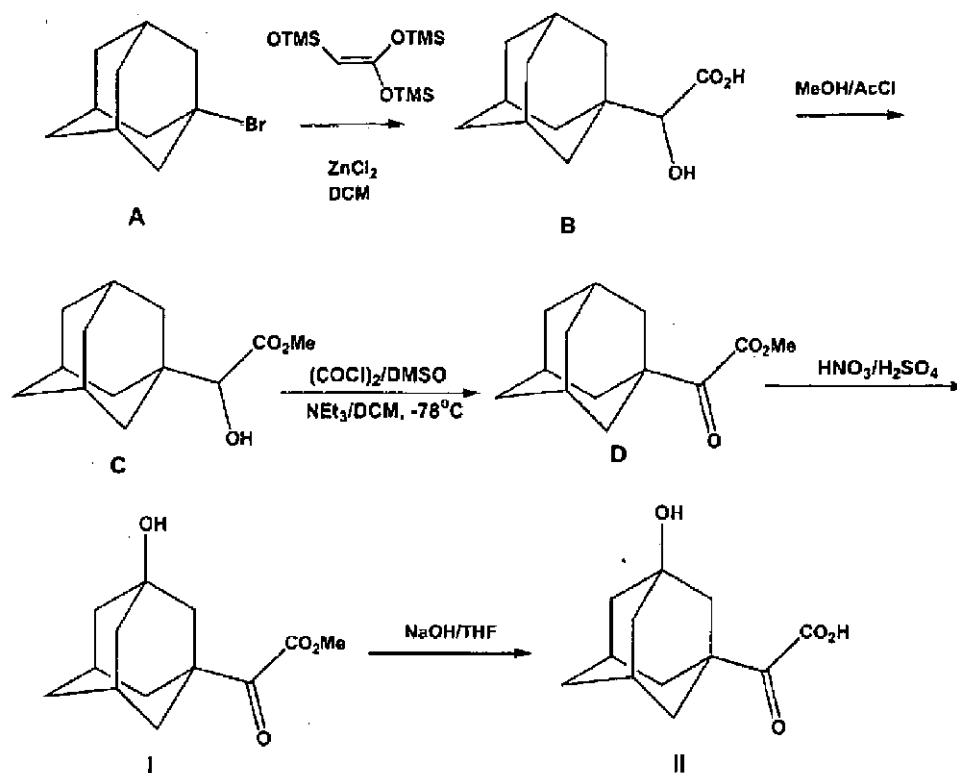
Para aislar el ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (mezcla racémica de Fórmula V) a partir de la mezcla racémica, la mezcla se trató mediante protección típica con Boc usando anhídrido de Boc e hidróxido de sodio en tetrahidrofurano para producir ácido α -[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3]hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto R). Entonces, el ácido α -[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3]hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto R) se mezcló con una base quiral, tal como [1R,2S]-(-)-1,2-difenilhidroxi etilamina, 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptano-2-amina, o S-(-)-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 varias horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se produce la cristalización del ácido (α S)- α -[[[dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Compuesto S). Véase también el Ejemplo 20 aquí.

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

También se describen aquí métodos 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 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 método representado gráficamente en el Esquema IV.

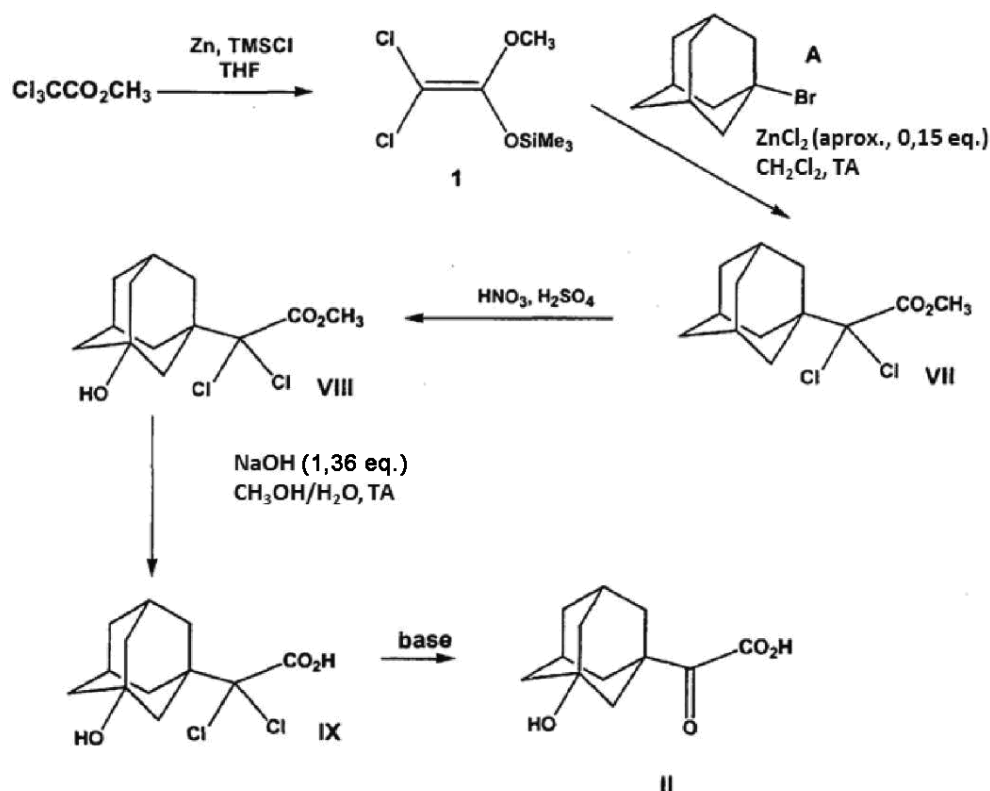
ESQUEMA IV



- 5 Tal como se muestra en el Esquema IV, en este método, el bromuro de adamantilo (Fórmula A) se alquila mediante catálisis con cloruro de cinc para producir ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B). A continuación, el ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) se esterifica usando 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). El éster metílico del ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula C) se convierte a continuación en éster metílico del ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula D) mediante oxidación de Swern. A continuación, el éster metílico del ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula D) se hidroxiló 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 entonces 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 aquí.

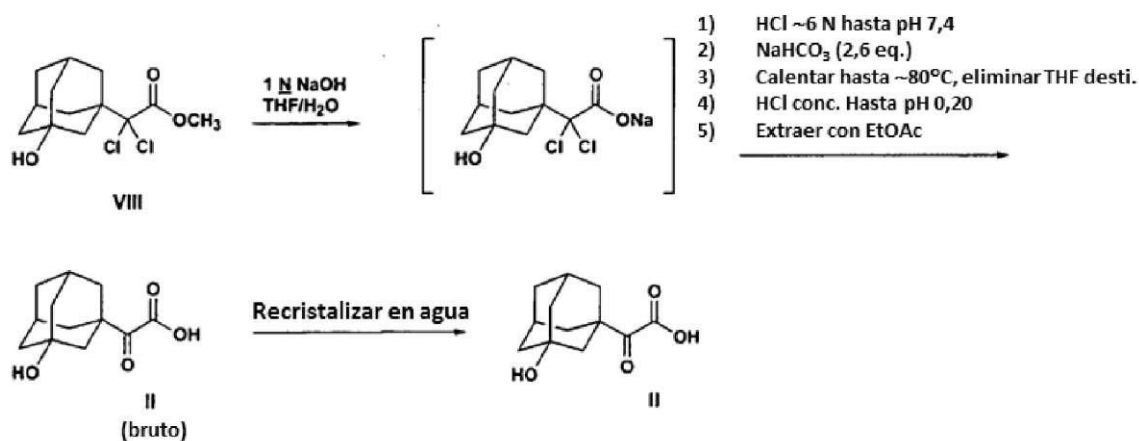
- 15 Alternativamente, el compuesto intermedio ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) se puede producir de acuerdo con el método representado gráficamente en el Esquema V.

ESQUEMA V



Tal como se muestra en el Esquema V, (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano 1 se preparó mediante modificación poco importante del método de Kuroda y col. (documento EP 08 08 824A3; Imashiro y Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315). El tratamiento de bromoadamantano con 1 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) produce el éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético de Fórmula VII. A continuación, el éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético de Fórmula VII se hidroxiló con óxido nítrico en ácido sulfúrico concentrado para proporcionar un rendimiento cuantitativo del éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula VIII. La hidrólisis de Fórmula VIII con hidróxido de sodio acuoso en metanol a temperatura ambiente produce 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, preferiblemente 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 (Fórmula II). Véanse también los Ejemplos 26 a 29.

ESQUEMA VA

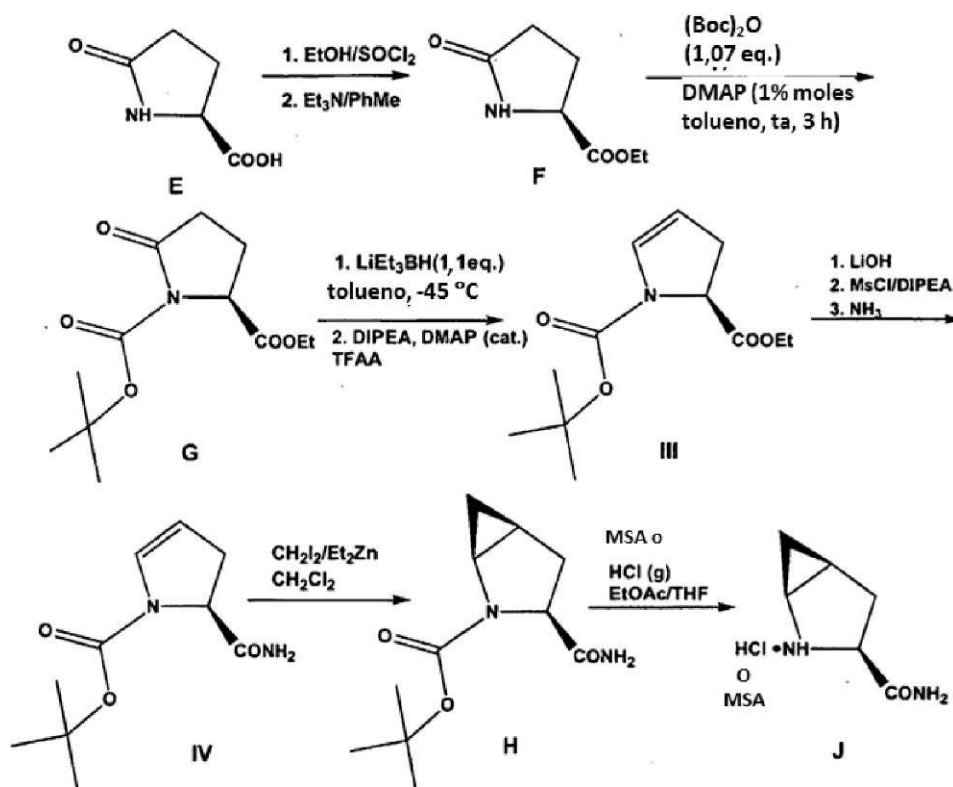


Tal como se muestra en el Esquema VA, el compuesto intermedio 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) se puede preparar en un procedimiento en un único recipiente. Como se observa, el tratamiento del

compuesto de Fórmula VIII con hidróxido de sodio acuoso en tetrahidrofurano (u otra base tal como hidróxido de potasio o hidróxido de litio) en una atmósfera inerte tal como argón, produce la sal de sodio correspondiente. 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 menor que alrededor de 0,50, preferiblemente alrededor de 0,20, para formar el cetoácido II correspondiente, que se puede recrystalizar en agua para formar cristales del cetoácido II.

También se describe aquí un método 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 método representado gráficamente en el Esquema VI que se muestra a continuación.

ESQUEMA VI



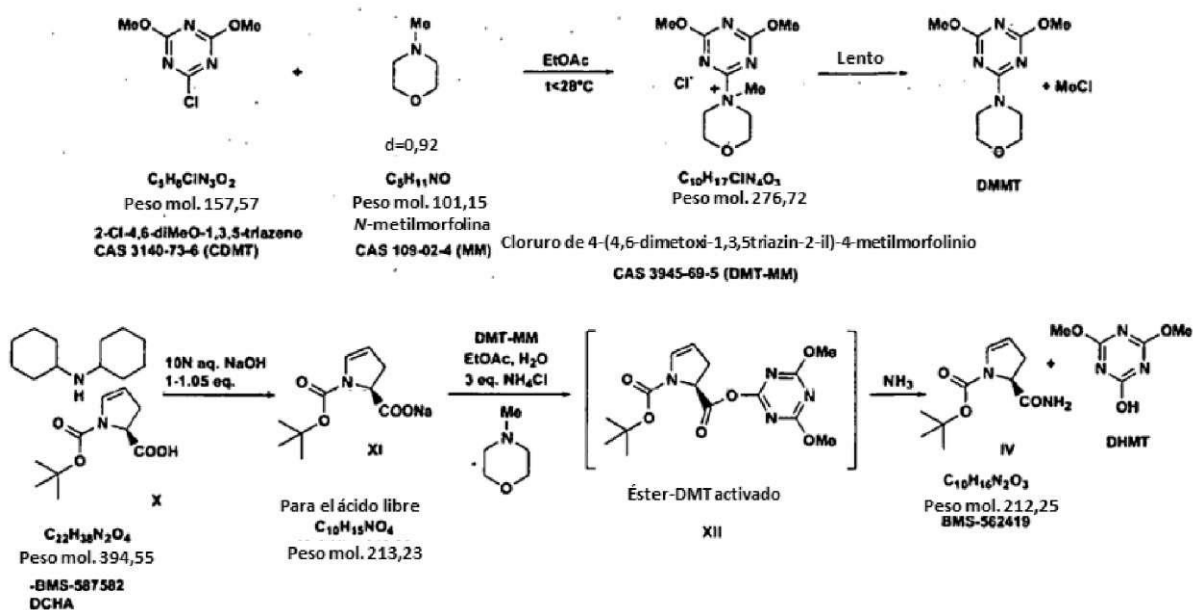
Tal como se muestra en el Esquema VI, el ácido L-pirolidínico (Fórmula E) se esterificó en primer lugar para producir el éster etílico del ácido L-pirolidínico (Fórmula F; SQ 7539). Este éster etílico del ácido L-pirolidínico se protege a continuación con BOC en el nitrógeno para producir el ácido (5S)-2-oxopirrolidin-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil),5-etil éster (Fórmula G). Entonces se llevó a cabo la reducción y eliminación del superhidruro para formar el ácido 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 de 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 ciclopropanó a continuación mediante la reacción de Simmons-Smith para producir el ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, 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 hidrocloruro 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.

También se describe aquí 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) en ácido [1S-(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, el cloruro de metileno se enfrió hasta -30°C y se añadieron dimetoxi etano y una disolución al 30% de dietil cinc en tolueno, seguido de la adición de diyodo metano. A continuación, esta mezcla se añadió al primer reactor, seguido de la adición de disolución de bicarbonato saturada. La mezcla de reacción resultante se agitó hasta que se formó un precipitado. A continuación el precipitado se filtró, 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 la fase orgánica se lavó con salmuera semisaturada. Se

eliminó el disolvente y se intercambi6 por heptano para obtener una suspensi6n de producto bruto de 6cido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxilico, 1,1-dimetil 6ster (Formula H) en heptano.

Alternativamente, el 6cido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxilico, 1-(1,1-dimetiletil) 6ster (F6rmula IV) se puede preparar tal como se muestra en el Esquema VIA.

ESQUEMA VIA



Tal como se muestra en el Esquema VIA, la sal de DCHA del 6cido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxilico, 1-(1,1-dimetil)6ster X se trat6 con una base de metal alcalino, tal como hidr6xido de sodio, para formar la sal correspondiente, tal como la sal de sodio.

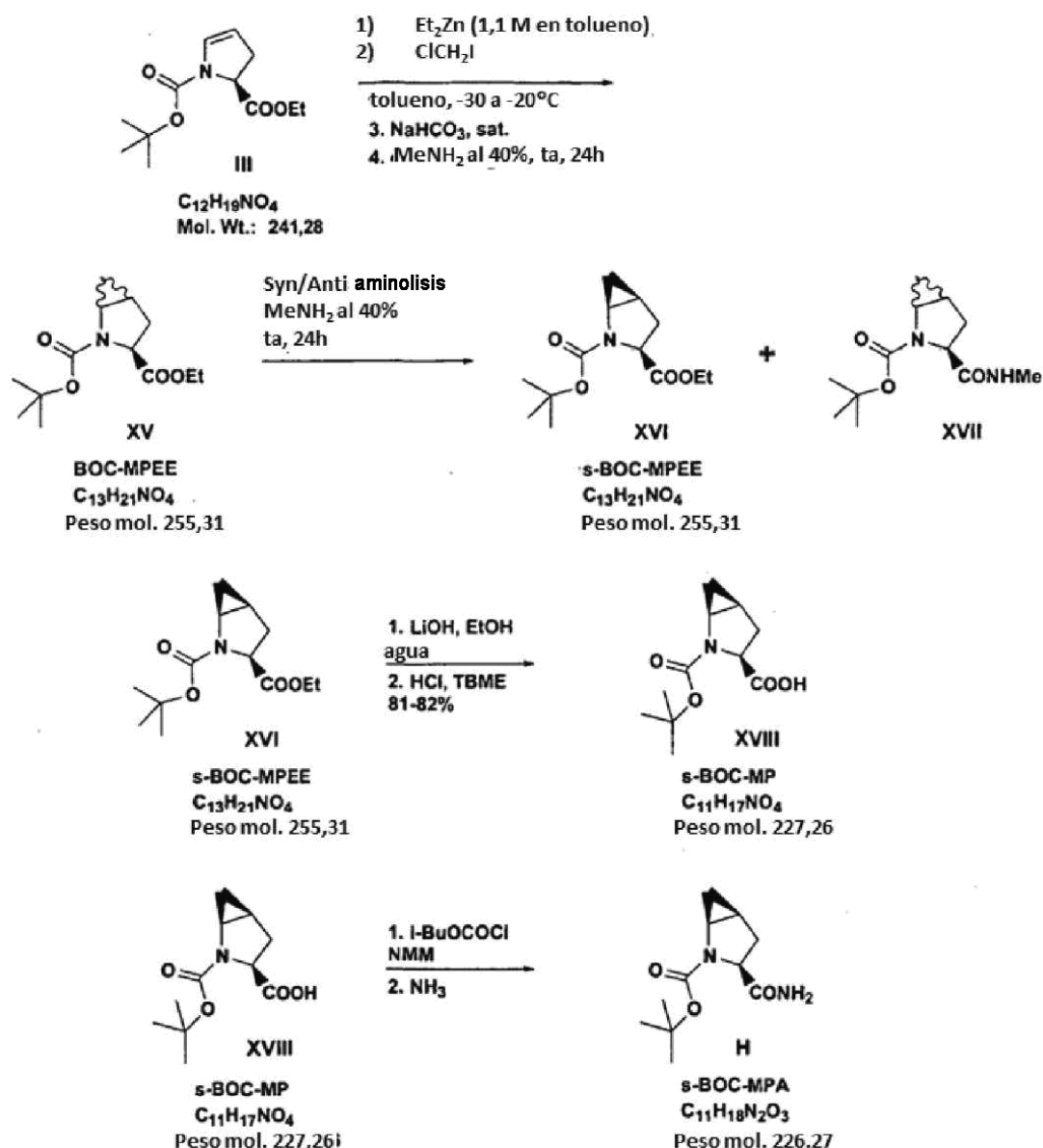
La sal de sodio del 6cido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxilico, 1-(1,1-dimetil)6ster XI tambi6n se puede preparar a partir del 6ster etilico correspondiente tratando el 6ster etilico (preferiblemente una disoluci6n del 6ster etilico en tolueno) con etanol e hidr6xido de sodio.

Se trat6 una disoluci6n de la sal de sodio XI con tamp6n, tal como cloruro de amonio y dihidrogenofosfato de sodio, para disminuir el pH de la disoluci6n por debajo de 7, preferiblemente alrededor de 6 a 6,5, y la disoluci6n tamponada de la sal de sodio se trat6 con cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM) para formar el 6ster de DMT activado XII, que se trat6 con amoniac6 u otra base, tal como sulfato de amonio, cloruro de amonio o hidr6xido de amonio, para formar el 6cido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxilico, 1-(1,1-dimetiletil)6ster IV.

El cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DTM-MM) se puede preparar 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 varian de alrededor de 0 a alrededor de $10^\circ C$ para formar DMT-MM.

La sal de DCHA del 6cido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxilico, 1-(1,1-dimetil)6ster X se puede preparar a partir de la sal de sodio XI correspondiente tratando una disoluci6n acuosa de sal de DCHA X preparada anteriormente con metil t-butil 6ter (MTBE) ajustando el pH de la mezcla de reacci6n hasta 2,5-3 empleando un 6cido tal como H_3PO_4 . La capa org6nica se separ6 y se trat6 con salmuera para formar la sal de sodio XI correspondiente. La mezcla de reacci6n resultante se enfri6 y se trat6 con DCHA para formar la sal de DCHA X correspondiente.

ESQUEMA VIB



El compuesto H del Esquema VI también se puede preparar tal como se muestra en el Esquema VIB mediante ciclopropanación del éster etílico de N-BOC 4,5-deshidroprolina III, según lo siguiente.

- 5 El éster etílico 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 de alrededor de -30 a alrededor de 0°C, para formar el éster etílico de N-BOC 4,5-metanoprolina XV.

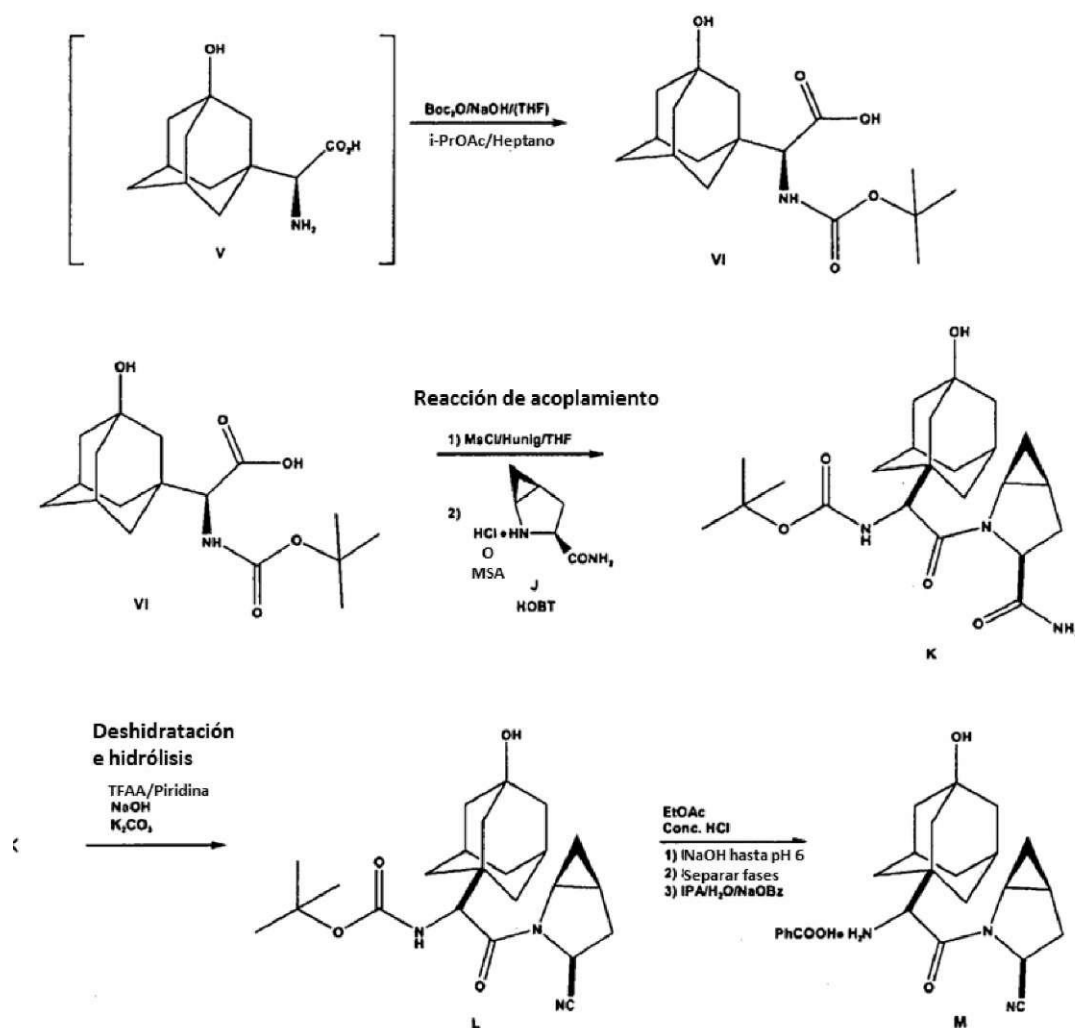
El éster etílico de BOC 4,5-metanoprolina XV (mezcla de isómeros sin y anti (8:1)) se separó tratando con metil amina acuosa en una atmósfera inerte tal como una atmósfera de nitrógeno, y se recuperó éster etílico de sin (S)-BOC-4,5-metanoprolina XVI (separado a partir de XVII).

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

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para acoplar los fragmentos 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 más abajo se representa gráficamente el acoplamiento de estos fragmentos.

ESQUEMA VII



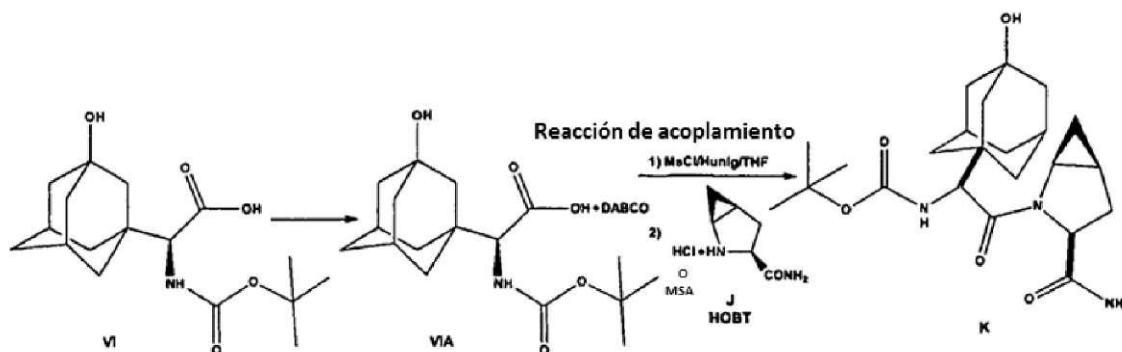
Tal como se muestra en el Esquema VII, el fragmento ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) se protege en primer lugar con BOC para producir el ácido (<aS)-<a-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) tratando V con BOC_2O en presencia de una base tal como hidróxido de sodio, y se separó mediante la extracción con acetato de etilo (EtOAc) para separar el ácido libre 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 puede usar sin aislamiento a partir de una bioconversión usando un concentrado de enzima PDH/FDH aislado como se muestra en el Ejemplo 8A.

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

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 del 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 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, 1,1-dimetil éster (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 reacción a hidrólisis enfriando hasta alrededor de 0 a alrededor de 10°C y añadiendo hidróxido de sodio u otra base fuerte, tal como KOH o LiOH , para formar el Compuesto L, 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, 1,1-dimetiletil éster (Formula L), que se desprotege a continuación (y se trata con benzoato de sodio) para formar el inhibidor de 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 aquí.

ESQUEMA VIIA



5

Tal como se muestra en el Esquema VIIA, el compuesto K se puede preparar también a partir del compuesto VIA (sal de DABCO) según lo siguiente.

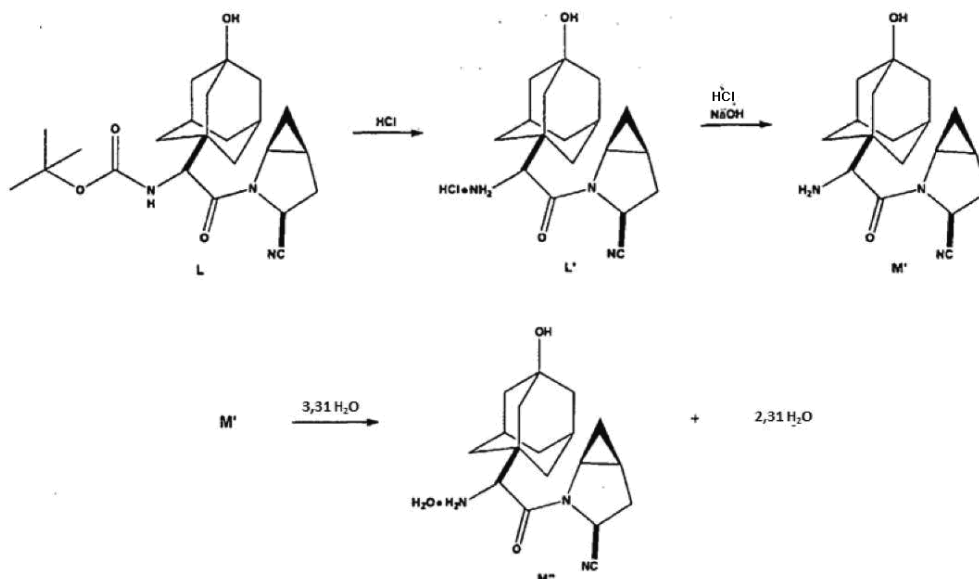
10

El ácido de Fórmula VI se trata con 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) para formar ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, sal de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (Fórmula VIA). A continuación se usó una reacción de acoplamiento (como se describe en el Esquema VIIA) para acoplar ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, sal de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (Fórmula VIA) a (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida HCl o sal de MSA (Fórmula J) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) u otro agente de acoplamiento conocido 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, 1,1-dimetil éster (Formula K).

15

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

ESQUEMA VIIIB



20

En referencia al Esquema VIIIB, el monohidrato de la base libre M'' se puede formar a partir del intermedio L protegido con BOC según lo siguiente.

El intermedio L protegido con BOC se trató con ácido clorhídrico concentrado en presencia de cloruro de metileno y metanol mientras se mantiene la temperatura de reacción en el intervalo de alrededor de 20 y 25°C, para formar la sal de hidrocloreto L'. La sal de hidrocloreto L' se trató con ácido clorhídrico y después hidróxido de sodio u otra base fuerte para formar la base libre M'. La base libre M' se trató entonces con agua para formar el monohidrato de la base libre M''.

Como entenderán los expertos en la técnica tras leer esta descripción, el producto final, 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) o su base libre correspondiente M', o monohidrato M'' de la misma, se puede producir usando todas las etapas representadas gráficamente en los Esquemas I, II, o III y IV, V, VI, VII y VIIA, o sólo 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 el material de partida. Por ejemplo, usando las enseñanzas de la presente invención, un experto en la técnica puede producir de forma normal el inhibidor basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo (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) 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 (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula V, el ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, sal de 1,4-dizabicyclo[2.2.2]octano de Fórmula VIA, o el ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster de Fórmula IV como el material de partida.

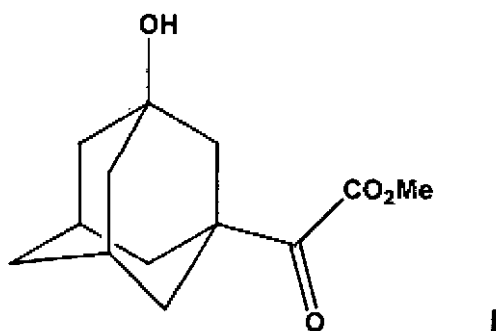
De este modo, un experto en la técnica puede producir un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV basado en pirrolidina fusionada con ciclopropilo sencillamente acoplando el ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VI) (o su sal de DABCO (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, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula K); deshidratando 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, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula K) para producir el 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, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula L); e hidrolizando el 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, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula L) para formar el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV. En este método, los materiales de partida comprenden los fragmentos, ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) (o su sal de DABCO (Fórmula VIA)) y la (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J).

Sin embargo, el método puede comprender además etapas para la producción del fragmento ácido (<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 método puede comprender además la producción del intermedio ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) reduciendo asimétricamente el ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) mediante aminación o transaminación enzimática (véase el Esquema I o II). Alternativamente, el método puede comprender además la síntesis química del ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) a partir del ácido tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) de acuerdo con el Esquema III.

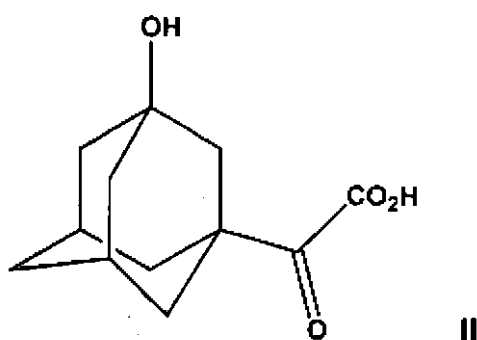
Además, o como alternativa, el método puede comprender además etapas para la producción del fragmento (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) mediante la eliminación de BOC a partir del intermedio ácido [1S-(1<a,3<b,5<a]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico,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

Se describen aquí nuevos compuestos que se identifican aquí 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:

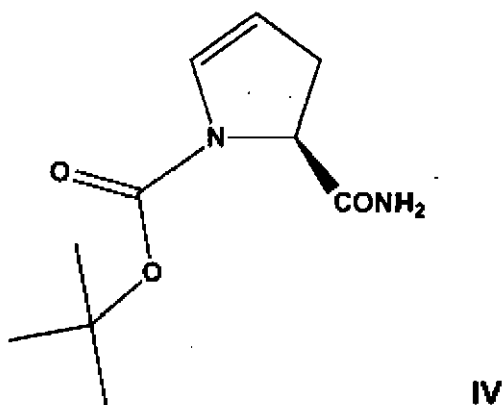
ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, éster metílico, como se representa gráficamente en la Fórmula I,



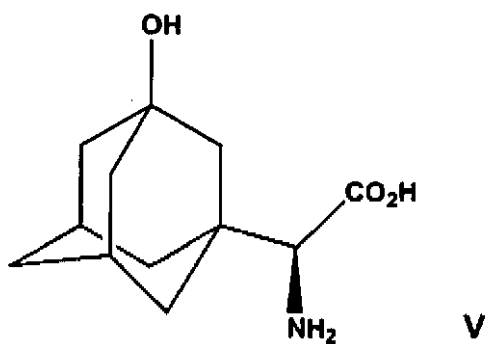
ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como se representa gráficamente en la Fórmula II,



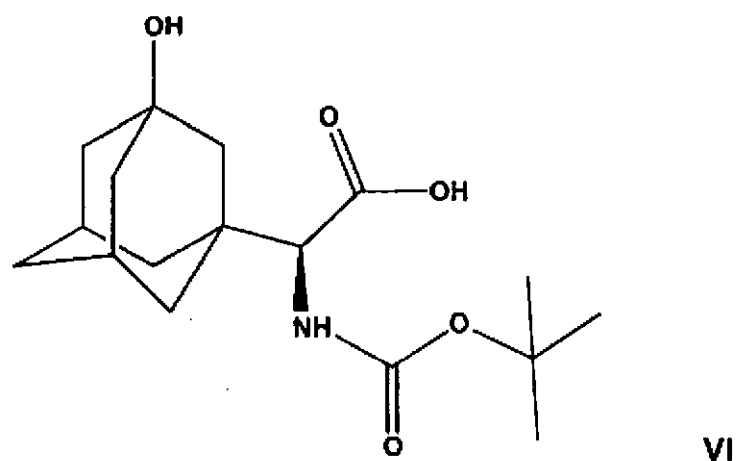
ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster, como se representa gráficamente en la Fórmula IV,



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

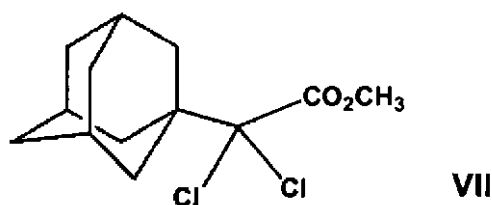


ácido (<aS)-<a[[1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como se representa gráficamente en la Fórmula VI,

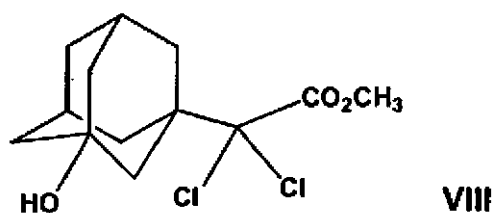


(o su sal DABCO VIA)

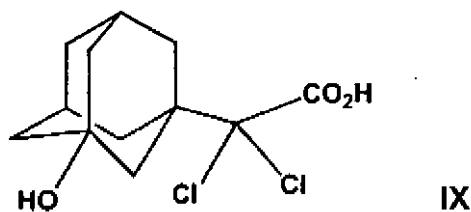
éster metílico del ácido adamantan-1-il-dicloro-acético como se representa gráficamente en la Formula VII,



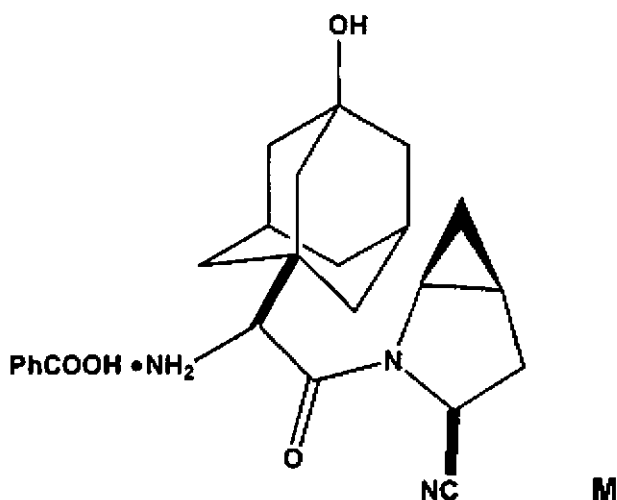
- 5 éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético como se representa gráficamente en la Formula VIII, y



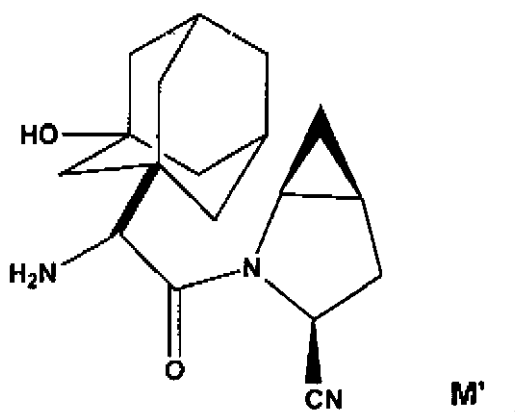
ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético como se representa gráficamente en la Formula IX.



- 10 Como se muestra aquí, estos compuestos se usan como intermedios en la producción de los inhibidores 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) como se representa gráficamente en la Fórmula M.



y preferiblemente la base libre correspondiente o su monohidrato como se representa gráficamente en las Fórmulas M' y M'', respectivamente,



5 o su monohidrato M'' (expuesto anteriormente aquí).

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

10 EJEMPLOS

EJEMPLO 1

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

15 Se añadieron células congeladas de *Pichia pastoris* recombinante (2,25 kg) que expresaban fenilalanina deshidrogenasa procedente de *Thermoactinomyces intermedius* a agua desionizada (6,75 l) que contenía formiato de amonio (28,65 g, 0,454 moles). Tras descongelar, las células se suspendieron usando 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% p/v en formiato de amonio 50 mM. Las células se rompieron mediante 2 pasadas a través de un microfluidizador a 12000 psi (82,74 MPa), y los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación del sobrenadante a 20.000xg y 4°C. Se añadió sobrenadante, 7024 ml, que contenía 230998 unidades o 124641 unidades de actividad de 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). El pH de esta disolución se ajustó 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 ditiotreitól (2,163 gramos, 14,027 mmoles), y la disolución se añadió 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, Método 2) y el cetoácido o el enantiómero R del aminoácido no detectable.

- 5 El ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético se aisló mediante un método 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 usando este procedimiento de aislamiento (una entrada de 787 gramos de cetoácido) 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 en ruta hacia (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.

15 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, ditiotreitolo 1,00 mM, y 250 mg de células de *Pichia pastoris* recombinante secadas térmicamente que contenían 32,7 unidades de fenilalanina deshidrogenasa, determinadas 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, y 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.

25 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, ditiotreitolo 0,84 mM, y 12,5% p/v de células húmedas de *Pichia pastoris* que contenían 6,06 unidades de fenilalanina deshidrogenasa, determinadas 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, y 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 usando células secadas térmicamente de *Escherichia coli* recombinante que expresan 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, ditiotreitolo 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, y 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, ditiotreitolo 0,84 mM, 1 unidad/ml (0,51 unidades/mg) de formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim), y 12,5% 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, y 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*

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, y 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 describe en la patente U.S. nº 6.068.991, concedida el 30 de mayo de 2000 a S.W. Liu y col.) usando cebadores oligonucleótidos que contenían los extremos 5' y 3' del gen FDH de *P. pastoris* junto con los sitios de escisión de endonucleasas de restricción compatibles:

5' TCGTCATGAAATCGTTCTCGTTTGG 3' (extremo 5'; sentido directo; SEC ID NO:1)

*Bsp*HI

5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT 3' (extremo 3'; anti-sentido; SEC ID NO:2)

*Bam*HI

Se llevó a cabo la amplificación mediante 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 plasmídico que contenía el gen FDH de *P. pastoris* clonado. Las condiciones de amplificación incluyeron la incubación a 94°C durante 4 minutos, seguido de 25 ciclos de incubación a 94°C durante 1 minuto; 50°C durante 1 minuto; y 72°C durante 1,5 minutos, usando un termociclador Modelo 480 de Perkin-Elmer con autoextensión.

La mezcla de reacción de la PCR se extrajo 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 microcentrífuga nuevo. El ADN se precipitó mediante adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol enfriado en hielo. Tras centrifugar a 13.000 x g durante 5 minutos, se aspiró el líquido desde el tubo, y el pelete se lavó con 0,5 ml de etanol al 70% enfriado en hielo. El líquido se aspiró de nuevo, y el pelete se dejó secar al aire durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El ADN amplificado se digirió con 20 unidades cada una de *Bsp*HI y *Bam*HI durante 3 horas a 37°C en un volumen total de 50 µl. En paralelo, el vector pBMS2000 (2 µg) se digirió con *Bsp*HI y *Bam*HI. Las muestras digeridas se sometieron a electroforesis en un gel de TAE agarosa 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 (Qiagen, Chatsworth, CA). Las concentraciones de los fragmentos aislados se estimaron 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. El ADN se precipitó mediante adición de 15 µl de dH₂O y 250 µl de 1-butanol, y se peletizó a 13.000 x g en una microcentrífuga durante 5 minutos. El líquido se eliminó mediante aspiración, y el ADN se secó en un SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NY) durante 5 minutos con poco calor. El pelete se resuspendió en 5 µl de dH₂O.

El ADN resuspendido se transformó mediante electroporación en 0,04 ml de células DH10B de *E. coli* competentes (Invitrogen) a 25 µF y 250 Q. Se añadió inmediatamente medio SOC (0,96 ml; SOC = extracto de levadura al 0,5%, triptona al 2%, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄; y 20 mM de glucosa por litro), y las células se incubaron en un agitador durante 1 hora a 37°C y 225 rpm. Se seleccionaron las colonias que contenían ADN plasmídico en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Los plásmidos con el inserto deseado se identificaron mediante PCR de colonias en tubos capilares usando el RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Cada mezcla de reacción contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 4 mM de MgCl₂, 0,25 mg/ml de seroalbúmina bovina, 2% de sacarosa 400, 0,1 mM de rojo cresol, 0,4 nM de cada cebador (SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2), y 2,5 U de Taq 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 redondo. Se aplicó una colonia resistente a kanamicina usando una aguja de inoculación de plástico desechable, se sometió a remolino 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 a la llama en ambos extremos. Las células se lisaron, y el ADN se desnaturalizó mediante incubación a 94°C durante 30 segundos; la amplificación se llevó a cabo usando 30 ciclos de incubación a 94°C durante 0 segundos; 40°C durante 0 segundos, y 72°C durante 60 segundos usando un Termociclador RapidCycler (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT). Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de TAE agarosa 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, p. 371-376 [1991]) por un cambio de al menos dos aminoácidos y 12 aminoácidos adicionales en el término 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 con 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 nativo y aminoácidos correspondientes:

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

Extremo 3' del gen PDHmod y 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 oligonucleotídicos que contienen el extremo 5' y 3' del gen PDHmod junto con los sitios de escisión de endonucleasas de restricción compatibles:

GATGCTCATATGCGCGACGTGTTGAAATGATG (extremo 5', sentido directo; SEC ID NO:3)

NdeI

GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTTCG (extremo 3', antisentido; SEC ID NO:4)

SmaI

Las condiciones de reacción para la amplificación y purificación de PDHmod mediante PCR fueron idénticas a las usadas para el gen FDH de *P. pastoris*, excepto que se incluyó ADN cromosómico preparado a partir de ATCC 74408 como molde para la reacción. El fragmento resultante se digirió con 20 unidades de cada uno de *NdeI* y *SmaI* durante 1 hora a 25°C, seguido de 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 iniciación (2 µg) se digirió con *NdeI* y *SmaI* usando condiciones idénticas. Las muestras digeridas se sometieron a electroforesis por separado en un gel de TAE agarosa 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 llevó a cabo la ligación de los dos fragmentos, la transformación de *E. coli*, y la selección de las colonias que contenían insertos con el gen PDHmod (formando pBMS2000-PDHmod) tal como se describe *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 de 1 hora a 37°C. Se añadieron diez unidades de T4 ADN polimerasa (Invitrogen) y 2 µl de una mezcla 2,5 mM de los cuatro desoxirribonucleósido trifosfatos, y la muestra se incubó a 11°C durante 20 minutos. La reacción se sometió a electroforesis en un gel de TAE agarosa 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*, el gen *groES*, y el gen PDHmod (como una fusión transcripcional). A continuación, pBMS2000-PPFDH (2 µg) se digirió con 10 unidades de la endonucleasa de restricción *SmaI* en un volumen de 50 µl durante 2 horas a 25°C, y 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 plasmídico se sometió a electroforesis durante 2 horas a 100 v en un gel de TAE agarosa al 1,0%, se aisló, y se extrajo con el kit QIAquick. Los dos fragmentos se ligaron 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, el ADN se transformó en células DH10B electrocompetentes. Se cribaron las colonias resistentes a kanamicina para determinar la presencia del gen PDHmod con los dos cebadores específicos de PDHmod como se ha descrito anteriormente para FDH. Se llevó a cabo una segunda ronda de cribado por PCR usando cebadores de ADN homólogos al extremo 5' del PPFDH y al extremo 3' del gen PDHmod, respectivamente. Sólo aquellos constructos que apoyan la amplificación de un fragmento de 1400 pares de bases poseyeron los dos genes en la misma orientación. Se encontró uno de dichos plásmidos y se confirmó la orientación mediante digestión por restricción de diagnóstico 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

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, glicerol al 4,0%, fosfato de sodio [dibásico] al 0,6%, fosfato de potasio [monobásico] al 0,3%, sulfato de amonio al 0,125%, sulfato de magnesio al 0,0256% [heptahidrato; añadido después de someter a autoclave a partir de una disolución estéril 1M], y 50 µg/ml de sulfato de kanamicina [añadido después de someter a autoclave a partir de una disolución de 50 mg/ml esterilizada por filtración]). Se registró la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀), y se añadieron al medio de MT5/kanamicina reciente células suficientes para conseguir una OD₆₀₀ de partida de 0,35. Los matraces se agitaron a 250 rpm, 28°C hasta que la OD₆₀₀ fue 0,8-1,0. Se indujo la expresión de ambos genes mediante la adición de isopropiltio-β-D galactopiranosido 1M (IPTG) esterilizado por filtración hasta una concentración final de 35 µM, y la fermentación continuó durante 24-48 horas. Las células se peletizaron mediante centrifugación a 6.500 x g durante 5 minutos, se lavaron una vez con un volumen igual de formiato de amonio 50 mM pH 7,0 y se volvieron a peletizar. Las células se almacenaron congeladas a -20°C o se usaron inmediatamente. El pelete 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 sometió a ultrasonidos 3 x 15 segundos usando un Desmembrador Sónico Fisher Scientific Modelo 50 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), ajuste de potencia 15 con una micropunta. Los desechos se peletizaron mediante centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La expresión se examinó mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se mezcló un µl del extracto celular con 5 µl de tampón 4X NuPAGE™ LDS (Invitrogen), y se llevó hasta 19 µl con agua destilada. Las muestras se calentaron a 70°C durante 10 minutos. Se añadió a la mezcla 1 µl de una disolución de ditiotretitol 1M y se aplicaron 10 µl a un minigel de NuPAGE™ Bis-Tris poliacrilamida al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a 200 v durante 50-60 minutos, y el gel se tiñó 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, sumergido en la tinción, se calentó en un horno de microondas hasta que fue evidente la ebullición, y después 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 justo 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 encontró también que las muestras poseían actividades tanto de FDH como PDH cuando se ensayaron 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 un litro. 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 dar 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. La disolución se añadió al tanque, seguido inmediatamente del inóculo. La OD₆₀₀ inicial fue de aprox. 0,35.

Los parámetros de funcionamiento de la fermentación fueron los siguientes:

volumen de trabajo de 16 litros

Temperatura: 28°C

Aereación: 1,0 vvm

Presión: 690 mbares

Agitación: 500 rpm

pH del control a 6,8 con NH₄OH según se requiera

La espumación se controló mediante la adición de UCON (una mezcla de disolventes fluorocarbonados producida por Dow Chemical Company) según demanda.

A una OD₆₀₀ de 0,8-1,0 (aproximadamente dos horas después de la inoculación), se añadió asépticamente IPTG esterilizado por filtración (disuelto en 500 ml dH₂O) para dar una concentración final de 35 µM. La fermentación continuó durante 48 h más, con lo que los contenidos del tanque se subenfriaron hasta 10°C. Las células se recogieron 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, el inóculo se preparó 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 OD₆₀₀, y se eliminó el volumen adecuado de células para dar 80 unidades de OD, y se añadió a 250 ml de medio MT5 reciente. Las células se añadieron asépticamente a 10 l de medio de MT5/kanamicina en un fermentador Braun (OD₆₀₀

inicial ~ 0,008) y se hicieron crecer bajo los parámetros de funcionamiento de la fermentación descritos *más arriba* durante 16 horas. A continuación, el cultivo se transfirió 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 OD₆₀₀ de partida de 0,30-0,35. La inducción, crecimiento, cosecha, y almacenamiento se llevaron a cabo como se ha descrito para la fermentación de 15 l.

EJEMPLO 8A

Producción escalonada de ácido (α S)- 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) a través del ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) usando un concentrado de enzima PDH/FDH aislado

Etapa 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 hizo pasar a través de un microfluidizador (Microfluidics modelo M-110Y, presión de funcionamiento 12.000-20.000 psi (2,74-13,79 MPa) (una pasada) para liberar la actividad de las células manteniendo la temperatura del caldo por debajo de 40°. La actividad de PDH/FDH del caldo microfluidizado fue 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. Después se añadieron 0,201 litros de polietilenimina ac. al 30% y se mezclaron durante 30 minutos. A continuación, la mezcla se filtró usando una prensa de filtro (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 nuevamente 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 casete de filtro de 100.000 MWCO (unidad Millipore Pellicon 2, casete de polietersulfona de baja unión a proteína, área de filtro de 0,5 m²). La velocidad de circulación de la bomba fue 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 enzimática global en el concentrado fue 84%.

Etapa 2: Aminación reductora

Se añadió ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) (1,00 kg; 4,46 moles) a una vasija de 20 l seguido de agua (5 l). La mezcla se agitó, y el pH se ajustó hasta 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 5 μ . El filtro se lavó con agua (2x1 l), y los filtrados y lavados se combinaron para dar una disolución transparente.

Con agitación, se añadió formiato de amonio (0,562 kg; 8,92 moles), y el pH se volvió a ajustar hasta ~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). El pH se volvió a ajustar a ~8,0 con NaOH 10N a temperatura ambiente.

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

Etapa 3: Protección con BOC

Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (1,022 kg; 4,68 moles) a una porción de la disolución de ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) (477,5 g; 2,12 moles). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente, con el 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 hasta ~8 con H₂SO₄ al 35%, y se añadió i-PrOAc (5,0 l) a la mezcla. El pH de la mezcla se ajustó a continuación hasta 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 una almohadilla de Dicalite (250 g) sobre papel de filtro en un embudo Buchner. La almohadilla de Dicalite se lavó adicionalmente con 2,5 l de i-PrOAc.

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

Los extractos orgánicos combinados (~15 l) se concentraron mediante destilación hasta ~4,5 l. A esta disolución se añadió a continuación heptano (~10 l) durante 10-15 min., mientras se mantuvo la temperatura a ~82-89°C. La

temperatura de la camisa del reactor se ajustó hasta 70°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora. La cristalización se produjo poco tiempo después del enfriamiento. A continuación, la temperatura de la camisa del reactor se ajustó a 40°C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 min.

- 5 La suspensión se enfrió hasta la temperatura ambiente, y a continuación se enfrió adicionalmente hasta 0-5°C. Después de una hora de agitación a 0-5°C, el producto se filtró. El producto se lavó con heptano (2,5 l), a continuación se secó a vacío a 40°C para dar 607,0 g (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

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

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

- 20 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 hasta 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), y a continuación la disolución se añadió a la botella que contenía el extracto de *Escherichia coli*. La botella 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 como se midió mediante el análisis de HPLC, y no hubo enantiómero R del aminoácido.

EJEMPLO 10

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

- 30 La disolución 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 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. La disolución se incubó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml sellado herméticamente a 40°C, 100 rpm durante 3 días, y 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

- 40 Se preparó una disolución que contenía en un volumen final de 1,0 ml 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 1 mg de transaminasa de cadena ramificada (Biocatalytics). La disolución se incubó en un tubo de microcentrífuga a 37°C durante 68 horas, y 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 de ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético restante.

EJEMPLO 12

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

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

- 50 Se usaron dos métodos de separación.

Método 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

5 volumen de inyección: 10 µl

Tiempo de retención del enantiómero S (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

Método 2:

10 columna: Regis Davankov Ligand Exchange 15x0,46 cm

fase móvil: 25% metanol/75% CuSO₄ 6 mM

caudal: 1 ml/minuto

temperatura de la columna: 40°C

detección: DAD ajustado a 240 nm

15 volumen de inyección: 10 µl

Tiempo de retención del enantiómero S de (ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético): 3,2 minutos

Tiempo de retención del enantiómero R: 11,2 minutos

Tiempo de retención del cetoácido (ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético): 5,2 minutos

20 EJEMPLO 13

Ensayo A de 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 hasta pH 8,75 con HCl. La disminución de la absorbancia se monitorizó a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad enzimática como µmoles/minuto basándose en las velocidades de cambio de la absorbancia.

25

EJEMPLO 14

Ensayo B de 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. El aumento de la absorbancia se monitorizó a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad enzimática como µmoles/minuto basándose en las velocidades de cambio de la absorbancia.

30

EJEMPLO 15

Ensayo C de 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 hasta pH 8,75 con HCl. La disminución de la absorbancia se monitorizó a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad enzimática como µmoles/minuto basándose en las velocidades de cambio de la absorbancia.

35

EJEMPLO 16

Ensayo de 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 de fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0. El aumento de la absorbancia se monitorizó a 340 nm. Se calcularon las unidades de actividad enzimática como µmoles/minuto basándose en las velocidades de cambio de la absorbancia.

40

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 la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se comprobó la finalización de la reacción mediante cromatografía de gases. Después se añadió NBS sólido (307 g) en porciones a la mezcla de reacción, y la mezcla de reacción se calentó 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 la monitorización mediante cromatografía de gases para asegurar la finalización de la reacción. Se añadió heptano (900 ml) a la mezcla de reacción. El cloruro de tionilo en exceso se eliminó mediante destilación a 78-80°C. Después se añadió agua con precaución (reacción violenta) para paralizar la reacción (volumen total de 1050 ml). Después se añadieron heptano (500 ml) y agua (600 ml), y la capa acuosa se separó de la capa orgánica. La capa orgánica se lavó con más agua (600 ml), y la capa acuosa se separó de nuevo de la capa orgánica. Se añadió más agua (150 ml) a la capa orgánica de heptano, y el heptano se eliminó de la capa acuosa mediante destilación. Específicamente, se co-destilaron 70 ml de agua con el heptano. Tras eliminar mediante destilación el heptano, se añadió tetrahidrofurano (THF; 1200 ml) a la capa acuosa, y la mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 16 horas para ralentizar la hidrólisis. La monitorización vía cromatografía de gases indicó la presencia de parte del cloruro de ácido sin reaccionar. Después se añadió más agua para acelerar la hidrólisis y se monitorizó la reacción mediante cromatografía de gases para asegurar la finalización. Después, el THF se eliminó mediante destilación, produciendo una mezcla de reacción bifásica (agua y aceite). Después 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. Después el sólido se eliminó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo (2 X 250 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. Después se trituró el residuo del licor madre (113 gramos de residuo) con agua y acetonitrilo (250 ml/250 ml) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después la reacción se filtró, y el sólido se secó para obtener un segundo cultivo de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (fórmula O); 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 cargó un matraz Erlen-Meyer con 315 ml de H₂SO₄ al 95-98% y después se enfrió a 8°C en un baño de hielo. Después se añadió al matraz HNO₃ (35 ml de una disolución al 50% preparada añadiendo 50 ml de HNO₃ al 70% a 30 ml agua), manteniendo la mezcla en un baño de hielo a 8°C. Después se añadió a la mezcla ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético sólido (Fórmula O) (92 gramos, 0,338 moles) en porciones durante aproximadamente 30 a 60 minutos de tal manera que la temperatura permaneció por debajo de 28°C. Después se agitó la reacción mientras se calentaba a 60°C, hasta que se obtuvo una disolución transparente.

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

Cuando se completó la reacción, la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se mantuvo así durante aproximadamente 16 horas. Después se añadió agua (700 ml) para paralizar la reacción hasta que no hubo desprendimiento de gases de color marrón. La suspensión resultante se enfrió en un baño de hielo hasta aproximadamente 5°C y después se filtró. El filtrado sólido se lavó con 200 ml de agua y se secó al aire para producir 90 gramos de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) como un sólido 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)

El 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 entonces a 65°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró entonces en un evaporador giratorio hasta un sólido. Se añadió EtOH (200 ml) al sólido concentrado y después se volvió a concentrar en un evaporador giratorio. 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 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, usando 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 ul, = 6,52 mg) se mezcló con la base quiral ([1R,2S]-(-)-1,2-difenil-hidroxietilamina) (0,25 M, 80 ul) en un vial, y la mezcla se evaporó hasta sequedad en el SpeedVac. Se añadió disolvente (200 ul). El vial que contenía la mezcla se colocó en un agitador con calentamiento a 50°C durante 1,5 horas. La mezcla se enfrió después a temperatura ambiente para la cristalización del ácido (α S)- 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)

Se introdujeron en una vasija seca 7,5 kg de bromuro de adamantilo. Después se añadió 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 volviera a 20°C. Después la mezcla de reacción se cargó con cloruro de cinc (1,05 kg) y se agitó durante aproximadamente 5 minutos a 20°C. Después la mezcla de reacción se cargó con tris(trimetilsiloxi)-etileno (15,3 kg) manteniendo 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 hasta 25°C, en cuyo momento la mezcla de reacción se diluyó con cloruro de metileno (15 litros) y se enfrió a 0 hasta 5°C. Después 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 vigorosamente durante 15 minutos y se dividieron las fases orgánica y acuosa. Se almacenó 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 después y se lavaron con agua (37,5 litros) seguido de agua semisaturada con salmuera (37,5 litros). La capa orgánica se separó de nuevo y se evaporó hasta formar cristales. Después 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 hasta 10°C durante 1 hora y se obtuvo el producto ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) mediante filtración. El rendimiento del ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) fue de 6,96 kg (33,11 moles, 95%).

EJEMPLO 21A

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

Se creó en primer lugar una atmósfera inerte en el reactor. Después el reactor se cargó con metanol (35,00 litros) seguido de ácido <a-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 hasta 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 hasta 25°C y se agitó durante 2 horas a 20 hasta 25°C. La mezcla de reacción se concentró entonces 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 hasta la 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 almacenó, mientras que las capas acuosas se combinaron y se ajustaron hasta un pH de 9,5 con una disolución 3 N de NaOH. Las capas acuosas combinadas se extrajeron entonces 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 almacenada. Estas capas orgánicas combinadas se lavaron entonces con una disolución saturada de bicarbonato de sodio (28,78 litros) seguido de salmuera (43,18 litros). Después se eliminaron todos los compuestos volátiles a vacío a 40°C, y se obtuvo un aceite incoloro a ligeramente amarillo que cristalizó al reposar. Este aceite contenía 13,29 kg (59,26 moles, 89%) de ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, metil éster (Fórmula C).

EJEMPLO 22

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

Se equipó un matraz de tres bocas (22 litros) con un agitador mecánico, una sonda de temperatura y un embudo de adición y se purgó con nitrógeno toda la noche. Después se añadió cloruro de oxalilo (500 ml, 5,73 moles) seguido de CH₂Cl₂ (8 litros). La disolución resultante se enfrió a -69°C con un baño de hielo seco/acetona. Después se añadió lentamente una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO; 700 ml 9,86 moles) durante aproximadamente 30 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de -60°C. La disolución se agitó durante 20 minutos manteniendo la temperatura a -60 hasta -70°C. Una disolución de ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, metil éster (Fórmula C) (990 gramos, 4,42 moles) en CH₂Cl₂ (1,7 litros) se añadió entonces lentamente durante aproximadamente 30 minutos manteniendo la temperatura interna por debajo de -60°C. La disolución resultante se agitó durante 30 minutos. Después se añadió NEt₃ (3 litros, 21,5 moles) para formar una suspensión pesada de sal de hidrocloreto de trietilamina. La mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se añadió agua (1 litro) para disolver la sal de trietilamonio (sal de TEA). La mezcla de reacción se transfirió entonces a un matraz de fondo redondo, y se concentró para eliminar el diclorometano (DCM) y el 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 de un lavado con salmuera (2 litros). Después la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro con evaporación, para producir un sólido

ligeramente amarillento del ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, metil éster (Fórmula D). El rendimiento fue aproximadamente del 104%.

EJEMPLO 23

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

Se cargó un matraz Erlenmeyer con H₂SO₄ al 95 hasta 98% (495 ml) y se enfrió en un baño de hielo a 8°C. Después se añadió HNO₃ (47,5 ml de una disolución al 50% preparada añadiendo 50 ml de HNO₃ al 70% a 30 ml de agua) al matraz, y la mezcla se enfrió de nuevo a 8°C en el baño de hielo. Se añadió lentamente ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, metil éster (Fórmula D) (100 gramos, 0,45 moles) a la mezcla, en porciones, durante 30 a 60 minutos para mantener una temperatura menor de 28°C. La mezcla de reacción se agitó enfriando mientras se enfriaba en el baño de hielo. El progreso de la reacción se monitorizó mediante cromatografía de capa fina (TLC) o mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (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 C18 de 4,6 x 50 mm, 3 micrómetros, 120 Ångström con un gradiente de acetonitrilo/H₂O al 10% hasta acetonitrilo al 100% en 7 minutos a un caudal de 2,5 ml/minuto. La longitud de onda de la monitorización fue 200 nm. Cuando se completó la reacción (después de aproximadamente 1 hora), la reacción se paralizó rápidamente mediante la adición de agua fría (1,5 litros) y EtOAc (500 ml). Se añadieron más agua y EtOAc (500 ml de cada uno) para ayudar en la separación de las capas acuosa y orgánica. Después 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 después a presión reducida hasta 130 gramos de un residuo oleoso amarillo que contenía el ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, metil éster (Fórmula I)

EJEMPLO 24

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

25 El residuo oleoso amarillo del ejemplo 23 se disolvió en tetrahidrofurano (300 ml) y se enfrió en un baño de hielo a 5°C. Se añadió lentamente un litro de hidróxido de sodio 1 N a la disolución para ajustar el pH a aproximadamente 7, manteniendo la temperatura por debajo de 30°C. Después se añadieron 500 ml adicionales de NaOH 1N para ajustar el pH a aproximadamente 14. Después se agitó la mezcla de reacción mientras se enfriaba en un baño de hielo, y el progreso se monitorizó mediante TLC o HPLC 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. La capa acuosa se acidificó con HCl concentrado. Cuando la disolución alcanzó pH 7, se añadió EtOAc (500 ml) seguido de HCl más concentrado hasta que el pH alcanzó 0,7. El HCl concentrado total añadido fue 150 ml. Después se extrajo la capa acuosa con EtOAc (4 x 400 ml), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 400 ml de agua seguido de 400 ml de salmuera. La capa orgánica lavada se secó entonces con MgSO₄ y se concentró. El rendimiento fue de 88 gramos de un sólido amarillo claro. La disolución de este sólido en 100 ml de EtOAc y 300 ml de heptano con agitación durante 30 minutos seguido de filtración y secado con aire produjeron 85 gramos de un sólido bronceado (85% de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)).

EJEMPLO 25

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

Se cargó un matraz de 2 litros, de tres bocas, equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un condensador, un embudo de adición para equilibrar la presión, y una entrada de argón con polvo de cinc (78,0 g, 1,19 moles) seguido de la adición de tetrahidrofurano 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 moles) y clorotrimetilsilano (80 ml, 0,648 moles) a una velocidad para mantener la temperatura de reacción a -55 hasta -60°C (se requirió 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 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). Después se concentró el filtrado a presión reducida en un evaporador giratorio (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 bruto como un aceite denso (129,2 g). La RMN cuantitativa de protones indica que este material bruto contiene 0,389 moles (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 mmoles). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla roja-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), con bicarbonato de sodio 1 N (3 x 150 ml), y con 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 la temperatura ambiente durante 1 hora. Tras enfriar hasta 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); p.f. 76,3°C

5 Análisis elemental: C₁₃H₁₈Cl₂O₂:

Calculado: C, 56,33; H, 6,55; Cl, 25,58%

Encontrado: C, 56,49; H, 6,59; Cl, 25,72%

RMN ¹H (500,16 MHz, CDCl₃) 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 ¹³C (127,78 MHz, CDCl₃) δ 166,130, 95,805, 53,969, 43,980, 36,842, 36,256, 28,309 ppm

EJEMPLO 26

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

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). Después de que se disipó el calentamiento de la mezcla, la disolución se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después el matraz se completó hasta la marca con agua para dar HNO₃ 10 N.

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

Tras agitar durante ~24 horas, la mezcla de reacción fue una disolución amarilla muy pálida. 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 hasta ~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 paralización), la mezcla resultante se transfirió a un embudo de separación (1 l) usando acetato de etilo adicional (~100 ml) para completar la transferencia. Se retiró la fracción acuosa y se extrajo con acetato de etilo (1 x 80 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (2 x 90 ml), con NaHCO₃ 1 N (4 x 90 ml), y con salmuera. Tras secar con sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se eliminó a presión reducida para dar el 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 Fórmula IX sin purificación. Si se desea, sin embargo, el material bruto (15,65 g) se puede recrystalizar en metanol (102 ml) y agua (85 ml) para producir un sólido de tipo algodón esponjoso (p.f. 114,8-115,0°C) con 91% de recuperación.

35 Análisis elemental: C₁₃H₁₈Cl₂O₃:

Calculado: C, 53,25; H, 6,18; Cl, 24,18%

Encontrado: C, 53,24; H, 6,24; Cl, 24,31%

RMN ¹H (500,16 MHz, CDCl₃) 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 ¹³C (127,78 MHz, CDCl₃) δ 165,929, 94,281, 68,932, 54,150, 44,478, 44,529, 44,020, 35,750, 34,759, 30,149 ppm

40 HPLC de Lab.:

YMC ODS-A S3 120 Å (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

45 Gradiente: 20% de A hasta 100% de B durante 10 minutos

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

EJEMPLO 27

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

- 5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con metanol (200 ml) y NaOH 1 N (194 ml, 194 mmoles, aproximadamente 1,36 equivalentes con respecto a la entrada de éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII)). La disolución resultante se enfrió en un baño de hielo hasta que la temperatura fue <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 mmoles). La suspensión resultante se dejó agitar a temperatura ambiente en argón. Tras agitar durante aproximadamente 6 horas, se usó una porción adicional de metanol (10 ml) para enjuagar las paredes del recipiente.
- 10 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 completar la transferencia. La disolución resultante se acidificó mediante la adición de HCl concentrado (38 ml, aproximadamente 456 mmoles). Se formó rápidamente un sólido blanco. La mezcla se agitó suavemente durante aproximadamente 20 minutos y después se
- 15 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 enfriada con hielo. Se eliminó el volumen del agua desde el sólido impulsando el aire a través de la torta del filtro. Después 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
- 20 98,7%); p.f. 238°C (desc.).

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.:

- 25 YMC ODS-A S3 120 Å (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

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

Tiempo de retención	% de Área	Identidad
0,53 minutos	0,95	desconocida
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 C (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 mmoles). Se añadió a este material agua (160 ml) y NaOH 1 N (138 ml, 138 mmoles; se usó NaOH 1 N para generar la sal sódica del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético para evitar problemas de espumación que podrían aparecer con el NaHCO₃ sólido) para dar una disolución turbia. A esta disolución se añadió NaHCO₃ sólido (29,10 gramos, 346 mmoles, 2,50 equivalentes). Después se añadió el NaHCO₃ a la mezcla de reacción que se convirtió en una suspensión a medida que la sal sódica del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético salía de la disolución. La vasija 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, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción (pH 7,22) se acidificó cuidadosamente (desprendimiento de CO₂) hasta un pH de 0,15 mediante adición de HCl concentrado (se requirieron 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 hasta 0,18 mediante adición de HCl concentrado (aproximadamente 2 ml). Se combinaron las fracciones de acetato de etilo y se lavaron con salmuera (100 ml). Tras secar sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se eliminó a presión reducida para dar ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) como un sólido granular incoloro: 30,77 gramos (99%).

Análisis elemental: C₁₂H₁₆O₄:

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

Encontrado: C, 64,30; H, 7,13%

RMN ¹H (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

RMN ¹³C (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 Å (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

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

Tiempo de retención	% de 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-adamantan-1-il)-acético

EJEMPLO 28A

Preparación de ácido 3-hidroxi-<a oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) empleando un método en un recipiente

Un matraz de tres bocas de 250 ml equipado con un embudo de adición para equilibrar la presión y una entrada de argón se cargó con éster metílico del ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)acético (Fórmula VIII), preparado como se describe en el Ejemplo 26 (15 g, 51,16 mmoles) seguido de la adición de tetrahidrofurano (30 ml, inestabilizado) Tras agitar durante algunos minutos, el volumen del éster metílico de la Fórmula VII se disolvió hasta dar una disolución turbia. A esta disolución se añadió agua destilada (30 ml) y se formó una suspensión suelta. El embudo de adición se cargó con NaOH 1N (69 ml, 69 mmoles, ~1,35 eq. con respecto a la entrada de compuesto de Fórmula VIII). Se añadió NaOH gota a gota durante 70 minutos para dar una disolución casi incolora que se dejó agitar a temperatura ambiente.

El análisis mediante HPLC a las -16 horas mostró la hidrólisis del compuesto de Fórmula VIII completo. La mezcla de reacción, una disolución incolora transparente con un pH de 13,24, se ajustó hasta pH 7,40 mediante la adición de HCl ~ 6 N (2,8 ml). Se añadió NaHCO₃ sólido (11,2 g, 0,133 moles, 2,60 eq.) para formar una suspensión.

El análisis mediante 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 hasta la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se almacenó en un refrigerador (+4°C) durante 4 días.

Tras el almacenamiento en frío durante 4 días, la mezcla de reacción era aún una disolución incolora transparente, y el análisis mediante HPLC mostró poco cambio, en caso de existir alguno, tras el almacenamiento. Tras calentar hasta la temperatura ambiente, la mezcla (pH 7,77) se acidificó hasta un pH de 0,20 mediante la adición cuidadosa de HCl conc. (se requirieron 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 hasta pH 0,18 mediante la adición de HCl conc. (se requirieron ~1,6 ml). 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. (se requirieron ~0,8 ml). 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 secar (MgSO₄), el disolvente se eliminó a presión reducida para dar el compuesto del título bruto de Fórmula II como un sólido granular casi incoloro, que se secó a vacío (bomba) durante 16 horas: 11,42 g (99,53% de rendimiento). HPLC, 100% (área %)

Análisis elemental: C₁₂H₁₆Cl₂O [55465-020-31, TR46373]

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

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

El compuesto bruto de Fórmula II (5,0 g) se disolvió con calentamiento a ~85°C en agua destilada (19 ml), después se retiró 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. Después 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%); p.f. 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%

EJEMPLO 29

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

Se cargó una vasija de reacción con etanol (49,0 litros) y se enfrió a -5°C. Después se cargó la vasija de reacción con cloruro de tionilo (4,97 kg) de manera que la temperatura de la mezcla no excediera 0°C. Tras la adición completa del cloruro de tionilo, se enfrió la mezcla de nuevo hasta -5°C, y se añadió ácido L-piroglutámico (Fórmula E) en porciones de manera que la temperatura se mantuvo entre 0 y -5°C durante la adición. Tras la adición del ácido, la mezcla de reacción se calentó a 20 hasta 25°C y se agitó durante 5 horas. La mezcla de reacción se evaporó entonces a vacío (T máx. 45°C) hasta aproximadamente un 15% de su volumen original. El aceite restante se disolvió entonces en tolueno (49 litros). Después se enfrió la disolución de tolueno hasta aproximadamente 10°C, y se añadió trietilamina (8,45 kg) lentamente de manera que la temperatura máxima fue entre 20 y 25°C. La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos y después 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, la mezcla se enfrió a 20 hasta 25°C y se cargó con una segunda porción de 8 litros de ciclohexano. La mezcla se enfrió entonces a 6 hasta 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 éster etílico del ácido L-piroglutámico (Fórmula F) como agujas incoloras.

EJEMPLO 30

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

El éster etílico del ácido L-piroglutámico (Fórmula F) (5,00 kg) se disolvió a temperatura ambiente en tolueno (24,97 litros). Después se añadió a la disolución 4-dimetilaminopiridina (0,19 kg). La mezcla de reacción se cargó entonces 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 completar la adición, la temperatura de reacción se agitó durante tres horas a 25°C. Después se cargó la mezcla de reacción con la disolución semisaturada de NaHCO₃ (49,94 litros) y se agitó vigorosamente 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 vez). La capa orgánica se evaporó entonces del disolvente a vacío a un máximo de 50°C. El aceite incoloro a ligeramente amarillento restante cristalizó al reposar. El rendimiento teórico fue de 8,18 kg, (31,81 moles) del ácido (5S)-2-oxopirrolidin-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil), 5-etil éster (Fórmula G).

EJEMPLO 31

Reducción y eliminación del superhidruro

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

EJEMPLO 32

15 Hidrólisis de BOC-DHPEE (Fórmula III)

Una disolución preparada a partir del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil), 5-etil éster (BOC-DHPEE) (Fórmula III) (6,00 kg) y etanol (24,00 litros) se enfrió a 0 hasta 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 entonces a 20 hasta 25°C y se agitó durante 2 horas a esta temperatura. Después 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 cargó con 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 de nuevo con 24 litros de TBME. Esta mezcla se enfrió después a 5 hasta 10°C, y se ajustó el pH a 2,3 hasta 2,3 usando H₃PO₄ al 85%-agua (1:4) mientras se agitaba intensamente. La temperatura se mantuvo durante este proceso a 5 hasta 10°C para la estabilidad. Las capas orgánica y acuosa resultantes se separaron. Se almacenó la capa orgánica, y la capa acuosa se extrajo de nuevo con 24 litros de TBME preenfriado a 5 hasta 10°C. La capa orgánica resultante se combinó con la capa orgánica almacenada y se cargó con diisopropiltilamina (DIPEA) (4,82 kg). La disolución se evaporó entonces y se desgasificó a una temperatura máxima de 30°C a vacío. El rendimiento fue de 7,84 kg (22,88 moles, 92%) [N-BOC deshidroprolina * DIPEA (BOC-DHP)].

30 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 hasta una disolución aproximada del 30%. Se eliminó el tolueno a vacío a 40°C. El BOC-DHP tratado (6,00 kg) se disolvió después en THF (48,0 litros). La disolución se cargó con DIPEA (2,26 kg), y la mezcla de reacción se enfrió a -20 hasta -25°C. Después se añadió lentamente cloruro de mesilo (3,01 kg). Durante esta adición, el hidrocloreto de DIPEA precipita. Después se agitó la suspensión resultante durante 2 horas a -20°C seguido de saturación con amoníaco mediante una entrada de gas subsuperficial. Añadiendo a la vez el amoníaco, la reacción se calentó hasta 0°C. Tras la saturación, la mezcla de reacción se calentó hasta 20°C y se agitó durante 3 horas. Tras la agitación, la mezcla de reacción se filtró para eliminar el hidrocloreto. 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 después 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 vez). Las capas orgánicas resultantes se combinaron y se concentraron a vacío y se desgasificaron para eliminar cualquier exceso de base de Hünigs. El rendimiento fue de 3,35 kg (15,77 moles, 90%) de ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) éster (BOC-DHPA) (Fórmula IV).

EJEMPLO 34

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

50 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 hasta -30°C. El Reactor B se cargó entonces con dimetoxietano (DME) (3,36 kg), seguido de una disolución al 30% de dietilcinc (15,36 kg) en tolueno, manteniendo la temperatura entre -30 y -25°C. Después se cargó el Reactor B con diyodometano (19,99 kg), manteniendo la temperatura de reacción entre -30 y -25°C. Tras terminar la adición del diyodometano, la mezcla se agitó durante 45 minutos a -30 hasta -25°C. Después se cargó esta mezcla en el Reactor A vía una tubería enfriada (-20 hasta -25°C). Se llevó a cabo lentamente la carga en porciones de aproximadamente 5%, de manera que la temperatura de reacción del Reactor A se mantuvo entre 22 y 24°C hasta que se completó la reacción. Tras completar la reacción, la mezcla del Reactor A se enfrió a 5 hasta 10°C. Después se cargó lentamente la mezcla de reacción con una disolución saturada de bicarbonato (21,6 litros) de manera que la temperatura de reacción no excediera 15°C. Tras esta adición, la mezcla de reacción se agitó durante al menos una hora mientras se formaba un precipitado. La

suspensión se filtró. La torta del filtro resultante se transfirió posteriormente a la vasija, 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). Después se separaron los filtrados en sus fases acuosa y orgánica, y la fase orgánica se lavó con salmuera semisaturada (21,6 litros). Después 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 después se secó a vacío hasta un peso constante. El rendimiento bruto fue de 2,76 kg (12,2 moles, 72%) de 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 hasta 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 moles, 55%) de 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

Desprotección 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 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 ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula H) (5,0 gramos, 22,1 mmoles) y THF (20 ml). Después se añadió HCl (2,5 M en EtOAc, 25 ml, 62,5 mmoles) a la suspensión. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, durante cuyo tiempo se observó precipitación. La finalización de la reacción se monitorizó mediante HPLC. Se añadió metil t-butil éter (MTBE) (30 ml) a la suspensión, y la agitación se continuó durante 30 minutos más. Después se filtró la suspensión con protección de N₂ para producir un sólido blanco que se lavó con MTBE (20 ml). El sólido se secó en un horno a presión reducida durante 48 horas para producir la sal del hidrocloreto de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J; 3,6 gramos 100%).

EJEMPLO 35A

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

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

A una suspensión de 10,4 g (25,86 mmoles) 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 NaOH ac. 10 N (27 mmoles) (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 sódica del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil), 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 mmoles; 1,5 eq.) en 70 ml de EtOAc mantenida en un baño de agua a temperatura ambiente se añadieron 4 ml (36,38 mmoles) 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, en cuyo momento se volvió una pasta espesa. La temperatura aumentó desde 23 hasta 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).

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

A una disolución de la sal sódica de la sal sódica de la parte A equivalente a 5 g (23,5 mmoles) de ácido libre de olefina según cuantificación mediante HPLC (V = 25 ml) se añadió NH₄Cl sólido (3,75 g, 70 mmoles, 3 eq.) en cuyo momento 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 sódica se transformó en una suspensión de DMT-MM preparada como anteriormente en la parte B.

La mezcla bifásica se agitó a r.t. durante 4 h, en cuyo momento la emulsión inicial se convirtió en una suspensión y precipitó algo de DHMT. Mediante 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, también se formó un 12-15% en peso de 4,6-diMeO-1,3,5-triazeno éter (DMT-éter) 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 las fases se dividieron. La fase orgánica rica se lavó con disolución acuosa 2N de NaH₂PO₄·xH₂O (2 x 25 ml) o hasta

pH (ac.) <6 que implicó que la mayoría de N-metilmorfolina se eliminó de la fase orgánica. Las fases se dividieron, y la fase orgánica rica se lavó con 25 ml de salmuera.

Típicamente, 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 orgánica rica se evaporó mediante rotación y se secó azeotrópicamente con EtOAc reciente (2 x 250 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. 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 caliente, y cada 30 min. se realizaron dos cargas adicionales de heptano, y la suspensión se agitó toda la noche a temperatura ambiente para completar la cristalización. El sólido se filtró y se secó. El rendimiento de la cristalización normal está cercano al 90%; la potencia del compuesto del título IV es del 90%, y se tiene en cuenta el DMT-éter para el 10% en peso restante.

Se encontró que el sólido formado era un co-cristal verdadero del compuesto del título IV, y que el DMT-éter proporcionó un único p.f. agudo de 97,4°C en comparación con el p.f. 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 dicitclohexilamínica del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletilo)

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

Se añadieron 3 volúmenes de etanol a una disolución toluénica del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) (aproximadamente 15% en peso hasta 25% en peso) (1 g/ml). La disolución se enfrió hasta 0-5°C. Se añadió lentamente a la disolución una disolución 5N de NaOH-agua (2 equivalentes), manteniendo la temperatura <5°C (ligeramente exotérmica). La mezcla de reacción se calentó hasta 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 la mezcla se agitó durante 10 minutos. Se formaron las capas acuosa y orgánica. La capa acuosa que contenía la sal sódica se separó, y usó en la parte B.

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

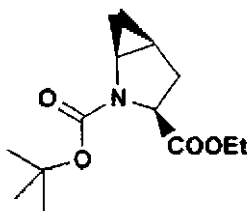
Se añadió 1 volumen de MTBE (0,74 g/ml) a una disolución acuosa de sal sódica del ácido 4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletilo). Se añadieron 0,2 volúmenes de heptano (0,684 g/ml) a la disolución anterior, y la disolución resultante se enfrió hasta 0-5°C. Se añadió lentamente a la disolución H₃PO₄ al 85% (1 g/ml) para llevar el pH hasta ~2,5-3, manteniendo 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 lentamente dicitclohexilamina (0,91 g/ml) (ligeramente exotérmica), manteniendo la temperatura <10°C. La mezcla de reacción se agitó a 0-5°C durante 3 horas. Los sólidos se eliminaron por filtración y se lavaron con 0,5 volúmenes de MTBE/heptano 1:1. La sal de DCHA resultante (1 g/ml) se secó y se recuperó.

EJEMPLO 35C

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

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



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

Se añadió gota a gota una disolución de 2,66 ml (6,43 g, 36,47 mmoles) de cloro yodometano en 2,2 ml de tolueno, manteniendo la temperatura de reacción entre -25°C y -30°C. La reacción se mantuvo a -20°C durante 16 h. Después la

reacción se paralizó con 22 ml de disolución semisaturada de bicarbonato y se calentó hasta la temperatura ambiente. Se formó un precipitado blanco que se separó mediante filtración sobre Hyflow (filtro auxiliar) y se lavó con tolueno (aprox. 10 ml). Se separó la capa orgánica del filtrado bifásico y se lavó dos veces con agua (11 ml cada vez). La capa orgánica se evaporó hasta sequedad para dar un aceite amarillento (2,33 g) que fue el éster etílico de N-BOC-metanoprolina (mezcla de isómeros syn- y anti- (8:1)).

5

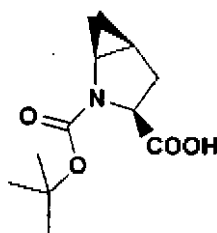
El procedimiento anterior se usó para preparar grandes cantidades de la mezcla anterior de isómeros, suficientes para su uso en la siguiente etapa. A 20-25°C, se agitaron vigorosamente 3,40 kg del éster etílico de N-BOC-4,5-metanoprolina (mezcla de isómeros syn y anti) con 5,17 kg (66,59 gmoles) de metilamina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

10

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 éster etílico de syn-N-4,5-metanoprolina (9,85 moles, 74%).

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



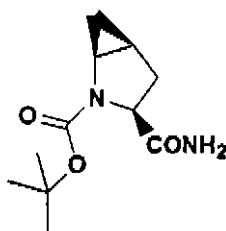
15

Se preparó una disolución de 2,57 kg de éster etílico de syn-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 recogió en 25,70 l de agua y 25,70 l de MTBE y se agitó durante 30 min. La fase orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo de nuevo con 12,85 l de MTBE. Se añadieron a la fase acuosa 25,70 l de MTBE, y el pH de la mezcla se ajustó a pH 2 mediante la adición de HCl 1N (aprox. 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 producir 1,88 kg de syn-N-BOC-4,5-metanoprolina (8,25% en moles, 82%).

20

25

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



30

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

35

La mezcla de reacción se calentó hasta -5°C y después se purgó mediante un tubo de entrada de gas con amoníaco (0,79 kg, teor., 5,00 eq). Después la mezcla de reacción se calentó hasta 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 sat. Después el pH de la mezcla se ajustó a pH 4 hasta 4,5 mediante adición de una disolución sat. de bisulfato de potasio. Después la capa orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 20,00 l de MTBE. Las capas orgánicas combinadas 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 aprox. 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 vez, y se secó a 30-35°C (vacío) para producir 1,64 kg (7,22 moles, 82%) de syn-N-BOC 4,5-metanoprolina amida (s-BOC-MPA).

40

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

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 enfriado con 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. Después se añadió Boc₂O sólido, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Después 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. Después se añadió EtOAc (4 litros) y se añadió más HCl para disminuir el pH hasta aproximadamente 1. El volumen total del HCl concentrado añadido fue de 510 ml. Las capas orgánica y acuosa se separaron de nuevo, y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 3 litros). Después las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (3 litros) y con salmuera (3 litros). Después se secó la capa orgánica lavada con Na₂SO₄ y se concentró en un evaporador giratorio 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 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, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula K)

Se cargó un matraz de 2 litros de 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 mmoles). 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. Después se añadió cloruro de metanosulfonilo (Mes-Cl) (13,1 ml, 169 mmoles, 1,1 equivalentes) como una única porción seguido de diisopropiletilamina (94 ml, 539 mmoles, 1,1 equivalentes). La diisopropiletilamina se añadió lentamente durante un periodo de alrededor de 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. Después se añadieron sal de hidrocloreuro de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (32,5 gramos, 200 mmoles, 1,1 equivalentes) e hidroxibenzotriazol (HOBT) (1,04 gramos, 7,6 mmoles, 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 después se dejó toda 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 la sal 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octánica del ácido (<aS)-<a[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VIA).

Fórmula VIA (sal de DABCO)

Se cargó 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) (15 g; 125,1 mmoles) en una disolución de aprox. 30 g (135 mmoles) del ácido de 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 de DABCO de Fórmula VIA (200 mg). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Se cargó agua (5 ml) lentamente a la mezcla de reacción, y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente 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 47 g (79%) de la sal de DABCO de Fórmula VIA.

EJEMPLO 39

Reacción de acoplamiento para producir 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, 1,1-dimetiletil éster (Fórmula K)

Se cargó un matraz de tres bocas de 250 l equipado con un termómetro, un agitador mecánico y una entrada de gas con la sal 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octánica 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 mmoles) preparada en el Ejemplo 38. Se añadió THF (25 ml) y se agitó para producir una suspensión. La suspensión se enfrió hasta 0°C en un baño de agua con hielo. Después se añadió cloruro de metanosulfonilo (Mes-Cl) (1,15 ml, 14,85 mmoles, 1,3 equivalentes) como una única porción seguido de diisopropiletilamina (94 ml, 40 mmoles, 3,5 equivalentes). La diisopropiletilamina se añadió lentamente durante un periodo de alrededor de 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 después sal de hidrocloreuro de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (2,42 gramos, 14,9 mmoles, 1,3 equivalentes) e hidroxibenzotriazol (HOBT) (77 mg, 0,57 mmoles, 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 después se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

EJEMPLO 40

Deshidratación e hidrólisis para producir 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, 1,1-dimetil éster (Fórmula L)

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

Después, la reacción se enfrió en un baño de enfriamiento hasta aproximadamente -3°C. Se añadió NaOH (5 N, 6 equivalentes, 0,925 moles, 185 ml) a la reacción durante 10 minutos (disolución acuosa pH = 9,9), manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 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, ac. 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).

Después se añadió 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 hasta 23°C desde 15°C; tiempo de adición: 5 min., ac. 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; ac. V = 780 ml, pH = 2,5, 415 mg de producto mediante HPLC; V orgánica = 800 ml, 1,02% v/v de piridina. La capa orgánica se lavó con 300 ml de salmuera; ac. V = 350 ml, pH = 1,8, 20 mg producidos mediante HPLC. La capa orgánica se lavó con 130 ml de disolución sat. de NaHCO₃; ac. V = 176 ml, pH = 6,0, 780 mg de producto. La capa orgánica se lavó con 300 ml de salmuera semisat. ac. V = 330 ml, pH = 5,2, 25 mg de producto; V orgánica = 650 ml, piridina 0,045% 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% v/v.

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

EJEMPLO 41

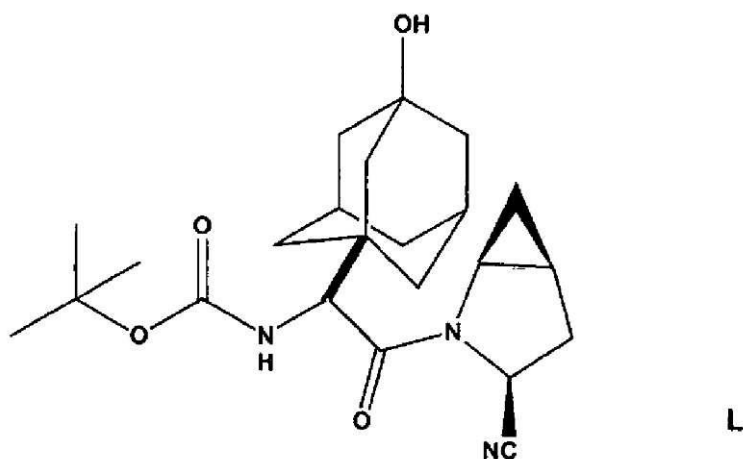
Desprotección para producir (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, benzoato (1:1) (Fórmula M)

Se cargó 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, 1,1-dimetiletil éster (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% p/p, 36,14 mmoles, 3 equivalentes) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó hasta que se produjo un sólido. Después se añadió agua (30 ml), y la mezcla se agitó durante 1 a 2 minutos. Esta mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación, 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 25% de NaOH, manteniendo la temperatura por debajo de 25°C.

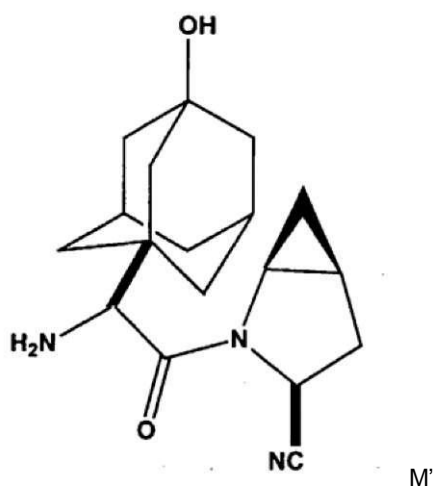
Después se llevó a cabo el intercambio de sales mediante la adición de alcohol isopropílico (IPA; 2 a 3 ml) a la capa acuosa seguido de la adición de benzoato de sodio (0,65 ml de una disolución de benzoato de sodio preparada disolviendo 2,6 gramos de benzoato de sodio en 6,5 ml de agua). Después se 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. Después 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. Después 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

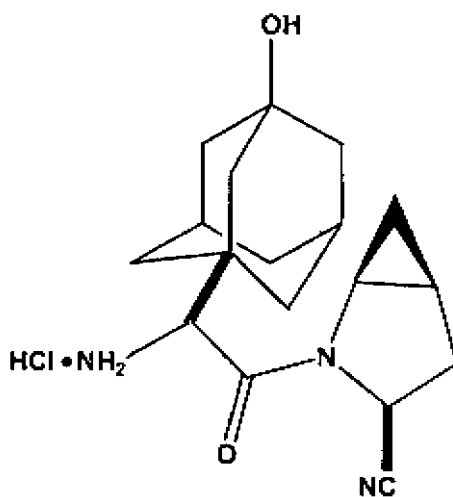


para producir la base libre M'



5 El compuesto (L) del Ejemplo 38 (300 g, 0,723 moles, potencia del 90,6%), cloruro de metileno (3 l), metanol (288 ml, 7,23 moles) y ácido clorhídrico concentrado (36%) (288 ml, 7,23 moles) se cargaron en un matraz de 12 l de 3 bocas equipado con un agitador mecánico, una sonda de temperatura y una entrada de gas N₂. La reacción se produjo manteniendo la temperatura de reacción en el intervalo de alrededor de 20 a alrededor de 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.

10 Se trató la fase orgánica que contenía la sal de hidrocloreuro



- (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 la temperatura de reacción entre 20 y 25°C para ajustar el pH entre 9 y 10,5. Se añadió NaCl (120 g), y la mezcla se agitó durante 20 min. para formar una división de fases. Se recogió la capa orgánica (6,2 l) (que contenía ~174 g del compuesto M'), y se descartó la fase acuosa (1,75 l) (que contenía 6,5 g de compuesto M').
- 5 Se lavó la capa orgánica con una disolución de salmuera de NH₄Cl al 1% (450 ml). (La disolución de salmuera de NH₄Cl al 1% contenía 1 g de NH₄Cl, 25 g de NaCl y 74 g de H₂O). A partir de la división de la fase resultante se recuperaron 6,0 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%).
- 10 Se añadió acetato de etilo (~4 l) a la capa orgánica mientras 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. La capa orgánica se filtró para eliminar el NaCl sólido y se concentró hasta ~1 kg (~170 g de compuesto M' en 1 l de acetato de etilo). Análisis de GC: DCM < 0,1%. Se añadió agua (17 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 rt a vacío
- 15 para dar 186 g de compuesto M', rendimiento del 81%.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bristol-Myers Squibb Company
- <120> Métodos y compuestos para producir inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV e intermedios de los mismos
- <130> LA0084
- 20 <150> 60/431.814
- <151> 2002-09-12
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- 25 <211> 26
- <212> ADN
- <213> Sintético
- <400> 1
- tcgtcatgaa aatcggtctc gttttg 26
- 30 <210> 2
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Sintético
- <400> 2
- 35 tactgttttt ccagcgattt cctaggct 28
- <210> 3
- <211> 33
- <212> ADN
- <213> Sintético
- 40 <400> 3
- gatgctcata tgcgcgacgt gtttgaaatg atg 33
- <210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Sintético

<400> 4

5 gatcccgggc taaggcgaat taataattcg 30

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Sintético

10

REIVINDICACIONES

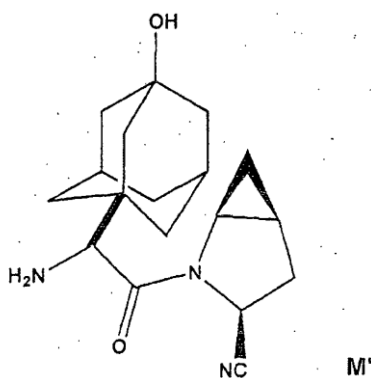
1. Un método para producir un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV a base de pirrolidina fusionada con ciclopropilo, que comprende:

(a) acoplar ácido (α S)- α -[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético o su sal de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano a la (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida para producir 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, 1,1-dimetiletil éster;

(b) deshidratar 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, 1,1-dimetiletil éster para producir 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, 1,1-dimetiletil éster;

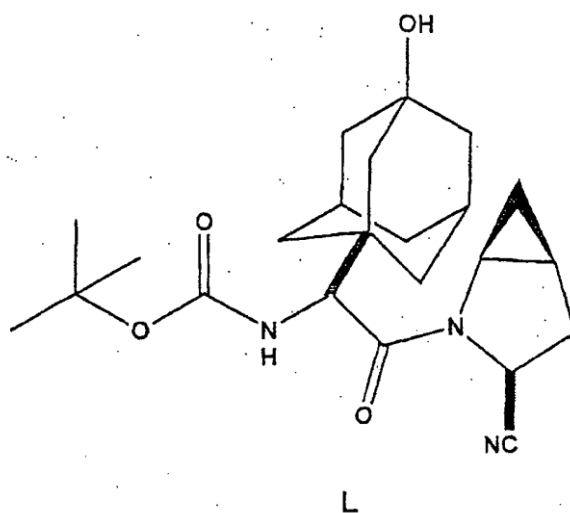
y
(c) desproteger ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbámico, 1,1-dimetiletil éster para formar el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV.

2. Un método para preparar una base libre del compuesto de estructura M'

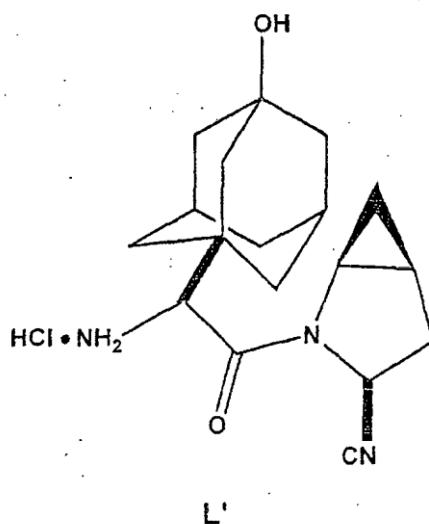


que comprende

proporcionar un compuesto protegido de la estructura L

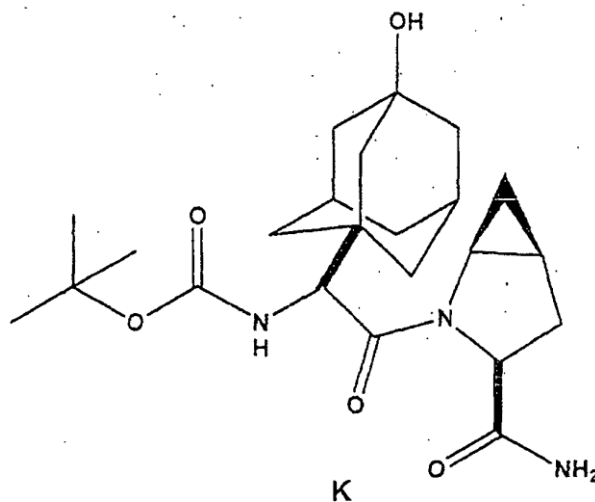


y tratar el compuesto L con ácido clorhídrico para formar la sal de ácido clorhídrico correspondiente L'



tratar la sal de ácido clorhídrico L' con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para formar la base libre del compuesto M'.

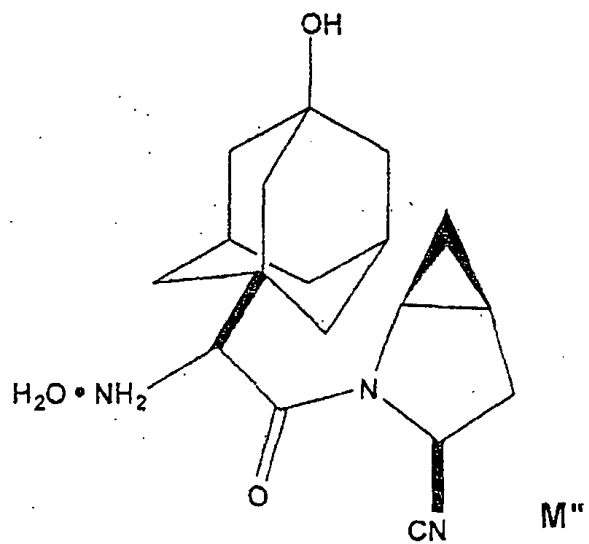
3. El método como se define en la reivindicación 2, en el que el compuesto L se forma deshidratando el intermedio K



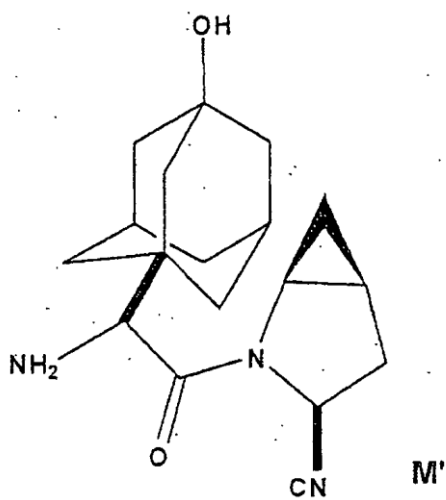
5

en presencia de piridina y anhídrido trifluoroacético, y después hidrolizando el producto de la reacción en presencia de una base fuerte para formar el compuesto L.

4. Un método para preparar un monohidrato de la estructura M''



que comprende tratar una base libre de la estructura



con agua para formar el monohidrato M''.