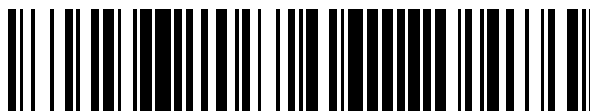


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 467**

51 Int. Cl.:

**C07D 317/34** (2006.01)

**C07D 405/04** (2006.01)

**C07D 473/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2005 E 05722747 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 1720840**

54 Título: **Métodos para la fabricación de nucleósidos de 1,3-dioxolano**

30 Prioridad:

**03.02.2004 US 541545 P**

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

**29.04.2016**

73 Titular/es:

**EMORY UNIVERSITY (100.0%)  
1380 SOUTH OXFORD ROAD, N.E.  
ATLANTA, GA 30322, US**

72 Inventor/es:

**SZNAIDMAN, MARCOS;  
PAINTER, GEORGE R.;  
ALMOND, MERRICK R.;  
CLEARY, DARRYL G. y  
PESYAN, AMIR**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 568 467 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).

**Métodos para la fabricación de nucleósidos de 1,3-dioxolano****Descripción****5 REFERENCIA A APLICACIONES ANTERIORES**

Esta aplicación declara la prioridad a la aplicación provisional de Estados Unidos 60/541,545, titulada "Métodos para la Fabricación de Nucleósidos de 1,3-Dioxolano" presentada el 3 de febrero de 2004.

**10 ÁREA DE LA INVENCION**

Esta aplicación suministra un proceso para preparar nucleósidos enantioméricamente puros de  $\beta$ -D-dioxolano. Específicamente, se describe una nueva síntesis de (-)-DAPD, adecuada para su desarrollo a larga escala.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El SIDA, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, es una enfermedad catastrófica que ha alcanzado proporciones globales. Actualmente un estimado de 40 millones de personas a nivel mundial están viviendo con SIDA, con aproximadamente 5 millones de nuevas infecciones cada año. La cantidad de muertes anuales todavía está por sobre los 3 millones de personas a nivel mundial. Otro virus que causa un problema de salud humano serio es el virus de la hepatitis B (HBV - hepatitis B virus). El HBV es 2º sólo al tabaco como una causa de cáncer en humanos. Algunos estimados ponen al número de gente a nivel mundial que se han infectado con HBV a niveles tan altos como 2 billones de personas, un tercio de la población mundial, con aproximadamente 400 millones de personas infectadas crónicamente.

Un número de 2',3'-dideoxynucleósidos han demostrado ser potentes agentes antivirales en contra del VIH y/o del virus de la hepatitis B. Después de una fosforilación celular del 5'-trifosfato por quinasas celulares, estos nucleósidos sintéticos son incorporados en una hebra creciente del ADN viral, causando la terminación de la cadena debido a la ausencia del grupo 3'-hidroxilo. Ellos también pueden inhibir la transcriptasa reversa enzimática viral.

También ha existido interés en la síntesis de derivados de nucleósidos en los cuales el 3'-carbono del nucleósido ha sido reemplazado con un heteroátomo. Ambos, el 3TC y su análogo de 5-fluorocitosina (FTC) muestran actividades en contra del VIH y del HBV (Furman, et al., *Antimic. Ag. Chemo.*, 1992, 2686-2692; y Cheng, et al., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267(20),13938-13942).

El descubrimiento de un nucleósido BCH-189 racémico de oxatiolano tuvo una actividad potente en contra de la replicación del VIH de acuerdo a Chu et al. para sintetizar los productos finales +) y (-)-BCH-189 (Belleau, et al., 5ª conferencia internacional acerca del SIDA, Montreal, Canadá, 4-9 de junio de 1989, #T.C.O. 1; Chu, et al. *Tetr. Lett.*, 1991, 32, 3791). El compuesto posterior, lamivudine, también conocido como 3TC o epivir, es usado actualmente clínicamente en el tratamiento de la infección de VIH y de HBV. El enantiómero (-) del análogo del oxatiolano de 5-fluorocitosina (FTC), es particularmente activo en contra del VIH (Choi, W. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 9377; Schinazi, R. F., et al., *Antimic. Ag. Chemo.* 1992, 2423; patentes de Estados Unidos números 5,204,466; 5,210,085; 5,914,331; y 5,639,814).

Los nucleósidos de 1,3-oxatiolano ya descritos son fabricados por medio de condensación de la purina sililada o la base de pirimidina con un intermediador de 1,3-oxatiolano. La patente de Estados Unidos número 5,204,466 presenta un método para condensar un 1,3-oxatiolano con una pirimidina sililada utilizando cloruro de estaño como un ácido de Lewis, que suministra virtualmente una  $\beta$ -stereoselectividad completa. Varias patentes de Estados Unidos describen los procesos para la preparación de nucleósidos de 1,3-oxatiolano por medio de la condensación de un éster de ácido 1,3-oxatiolano-2-carboxílico con una base sililada protegida en la presencia de un ácido de Lewis que se basa en silicona, seguido por la reducción del éster al grupo correspondiente de hidroximetilo para generar al producto final (refiérase a las patentes de Estados Unidos 5,663,320; 5,693,787; 5,696,254; 5,744,596; 5,756,706 y 5,864,164). Adicionalmente, estas patentes contienen presentaciones genéricas de la síntesis de los nucleósidos de 1,3-dioxolano en una forma similar utilizando el intermediador correspondiente de 1,3-dioxolano.

La patente de Estados Unidos número 5,272,151 presenta un proceso que utiliza un 2-O-protegido-5-O-acilado-1,3-oxatiolano para la preparación de nucleósidos por medio de la condensación con una base purina o una base pirimidina sililada en la presencia de un catalizador de titanio. La patente de Estados Unidos número 6,215,004 presenta un proceso para la producción de nucleósidos de 1,3-oxatiolano que incluye la condensación de 2-O-protegido-metil-5-cloro-1,3-oxatiolano con una 5-fluorocitosina sililada sin un catalizador de ácido de Lewis. En estos casos, el anillo de 1,3-oxatiolano es preparado en una de las siguientes formas: (i) la reacción de un aldehído derivado de un ácido glioxilato o glicólico con ácido mercaptoacético en tolueno en la presencia de un ácido p-toluenesulfónico para generar al ácido 5-oxo-1,3-oxatiolano-2-carboxílico; (ii) la ciclización de glioxilatos anhídridos con dietilacetil de 2-mercaptoacetaldehído a reflujo en tolueno para generar la lactona; (iii) la condensación del éster del ácido glioxílico con mercaptoacetaldehído (forma dimérica) para generar un éster de 5-hidroxi-1,3-oxatiolano-2-carboxílico o (iv) el acoplamiento de un aciloxiacetaldehído con 2,5-dihidroxi-1,4-ditiano, la forma

dimérica del 2-mercaptoacetaldehído para formar un 2-(ailoxi)metil-5-hidroxi-1,3-oxatiolano. La lactona, el compuesto 5-oxo, debe ser reducido al correspondiente lactol durante el proceso. El ácido 2-carboxílico o su éster también han sido reducidos a los derivados correspondientes de 2-hidroximetilo con un complejo borano-metilsulfuro.

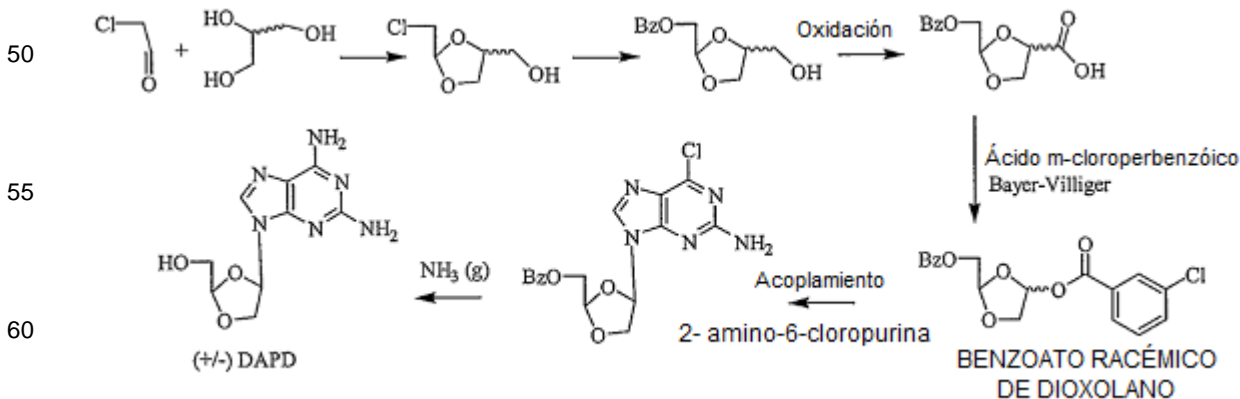
5 El intermediador clave, el aldehído, puede ser preparado utilizando algunos métodos: (i) la oxidación del tetraacetato de plomo de meso-eritritol de 1,4-di-O-benzoilo, D-manitol de 1,6-di-O-benzoilo o 1,5-di-O-benzoil-D-arabitol; (ii) la preparación de un glicol de etileno monoacetilado seguido por la oxidación al aldehído; (iii) la acilación de clorohidrina de etileno seguido por una oxidación del dimetilsulfóxido; (v) la oxidación del tetraacetato de plomo; (vi) la ozonólisis de alilo o del acilato de 3-metil-2-buten-1-ol; (vii) y más recientemente, por medio de la acilación del 2-buten-1,4-diol seguido por la ozonólisis. Además, la patente de Estados Unidos número 6,215,004 presenta un proceso para preparar el dietilacetal de aciloxiacetaldehído por medio de la acilación del 2,2-dietoxietanol.

15 Norbeck, D. W., et al. (Tet. Lett., 1989, 30, 6263) reportó la síntesis de (6)-1-(2 $\beta$ ,4 $\beta$ )-2-(hidroximetil)-4-dioxolanil-timina, que resulta en una mezcla racémica de diaestereómeros alrededor del átomo C4'. El análisis de cristalografía de rayos X del producto reveló que el anillo de dioxolano adopta la conformación 3T4 observada comúnmente en ribonucleósidos, con el átomo O3' en la posición endo, que es muy diferente a las conformaciones distorsionadas de 3E observadas en AZT, AZDU, ddA, ddC, y la 3'-deoxi-3'-fluorotimidina, todas las cuales exhiben una actividad potente in vitro en contra del VIH.

20 La actividad antiviral de los nucleósidos de dioxolano impulsó a Chu *et al.* a sintetizar una serie de análogos en una búsqueda de agentes antivirales y/o anti cáncer potentes. Por ejemplo, la aminopurina de 9-( $\beta$ -D hidroximetil-1,3-dioxolanilo) ( $\beta$ -DDAPD), y su metabolito 9-( $\beta$ -D hidroximetil-1,3-dioxolanil)-guanina ( $\beta$ -D-DXG) han demostrado tener una actividad potente y selectiva en contra del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) y el virus de la hepatitis B (HBV - hepatitis B virus) (Rajagopalan et al., Antiviral Chem. Chemother., 1996, 7(2), 65-70). (-)-DAPD es un inhibidor potente y selectivo del VIH in vitro e in vivo de la replicación de HBV in vitro (Furman, et al. Drugs of the Future (Medicamentos del Futuro) 2000, 25 (5), 454-461). Similarmente, la 1-(P-L hidroximetil-1,3-dioxolanil)-timina (Dioxolano-T) (Norbeck et al., Tet. Lett., 1989, 30, 6263-66) posee una actividad anti-VIH y anti-HBV. Se descubrió que la 1-( $\beta$ -L hidroximetil 3-dioxolanil)-citidina ( $\beta$ -L-OddC) tiene una actividad antitumoral potente hacia la próstata humana, así como hacia el carcinoma renal (Kadhim et al., Can. Cancer (Cáncer) Res., 57(21),4803-10, 1997). El (-)-(2'S,4'R)-1'-[2'-(hidroxi-metil)-1',3'-dioxolano-4'-il]-5-yodouracilo L-IOddU está actualmente en estudios pre-clínicos o clínicos para evaluar su valor como un agente antiviral o anti cáncer (refiérase a Kim, et al., J. Med. Chem. 1993, 36, 519-528 y a las referencias allí mencionadas; Corbett, & Rublein, Curr. Opin. Investig. Drugs 2001, 2, 348-353; Gu, et al., Antimicrob. Agents (Agentes) Chemother. 1999, 43, 2376-2382; Mewshaw, et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2002, 29, 11-20).

35 US 5,041,449 y US 5,270,315 otorgadas a Belleau et al. presentan un grupo genérico de 2-sustituidos-4-sustituidos-1,3-dioxolanos racémicos. La tabla 1 de la referencia muestra información para 2 nucleósidos racémicos de 1,3-dioxolano - un nucleósido racémico de 1,3-dioxolano de trans ( $\alpha$ ) con una base de citosina (compuesto XII) y un nucleósido racémico de 1,3-dioxolano cis ( $\beta$ ) con una base adenina (compuesto XIV), refiérase también a EP 0 337 713 otorgado a IAF BioChem International).

45 En junio de 1989, Belleau, et al., reportó un método para la síntesis de nucleósidos de citidina que contienen oxígeno o sulfuro en la posición 3' (Belleau, B., et al. la 5ª conferencia internacional del SIDA, Montreal; International Development Research Centre: Ottawa, Ontario, 1989; T.C.O.1.). El anillo dioxolano fue preparado por medio de la condensación del RCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO con glicerina. La síntesis resultó en una mezcla racémica de diaestereoisómeros alrededor del carbono C4' del nucleósido. El DAPD racémico fue sintetizado tal como se muestra en el Esquema 1.

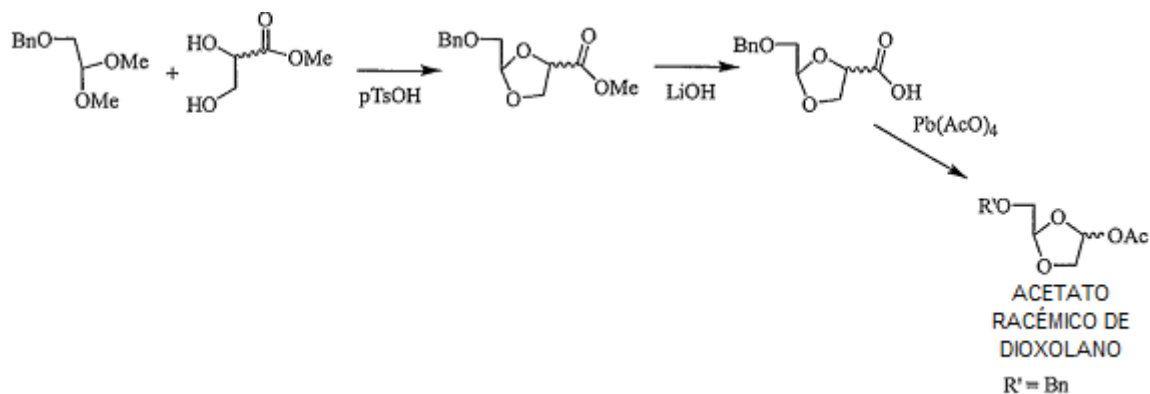


Esquema 1

65

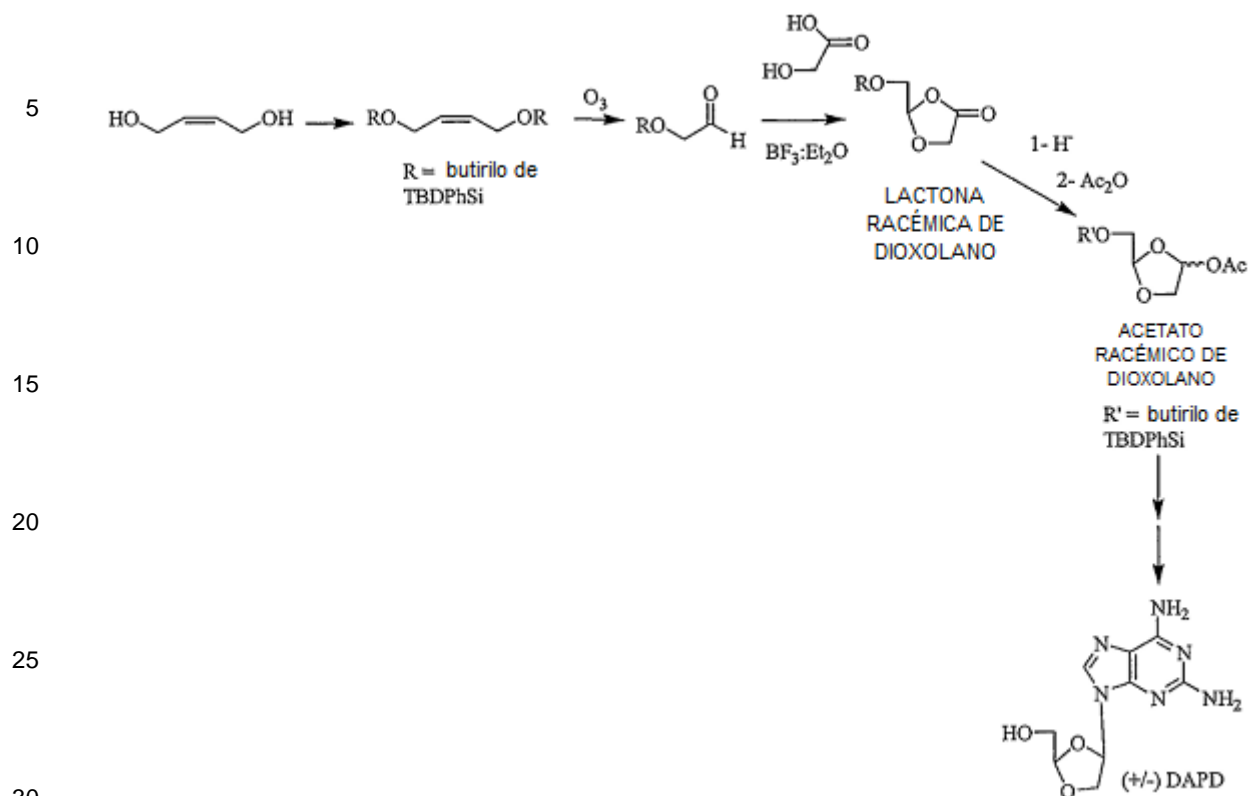
Belleau et al. reaccionaron glicerol y cloroacetaldehído para generar un intermediador dioxolano. Después del desplazamiento del cloro con una sal de ácido benzoico, la oxidación del alcohol primario a un ácido carboxílico y una reorganización Baeyer-Villiger con un ácido m-cloroperbenzoico, se obtuvo el benzoato racémico de dioxolano correspondiente. Este compuesto fue acoplado entonces con 2-amino-6-cloropurina y el intermediador nucleósido resultante fue reaccionado con amonio bajo presión para generar al DAPD racémico. El (6)-Dioxolano-T también fue sintetizado en una forma similar por Choi *et al.* (Choi, et al., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 9377-9378 y la patente de Estados Unidos número 5,852,027).

Tal como se mencionó anteriormente, en la última parte de 1989, Norbeck et al. publicó un artículo que describió la síntesis de una timidina racémica de cis-1,3-dioxolano que también tuvo una actividad anti-VIH in vitro (Norbeck, et al. Tet. Let. 1989, 30 (46), 6263-6266). El producto fue sintetizado en 5 pasos desde el dimetilacetal de benciloxialdehído y glicerato de (6)-metilo para producir un 79% de producción de la mezcla diaestereomérica 1:1. Tal como en la síntesis Belleau, la síntesis Norbeck resulta en una mezcla racémica de diaestereoisómeros alrededor del carbono C4' del nucleósido. Refiérase al Esquema 2.



### Esquema 2

El mismo intermediador racémico de acetato de dioxolano fue sintetizado por Liotta et. al. Empezando desde cis-2-buten-1,4-diol (Choi, et al. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113 (24), 9377-0379 y Wilson, et al. Bioorg. Med. Chem. Let. 1993, 3 (2), 169-174). Refiérase al Esquema 3.



### Esquema 3

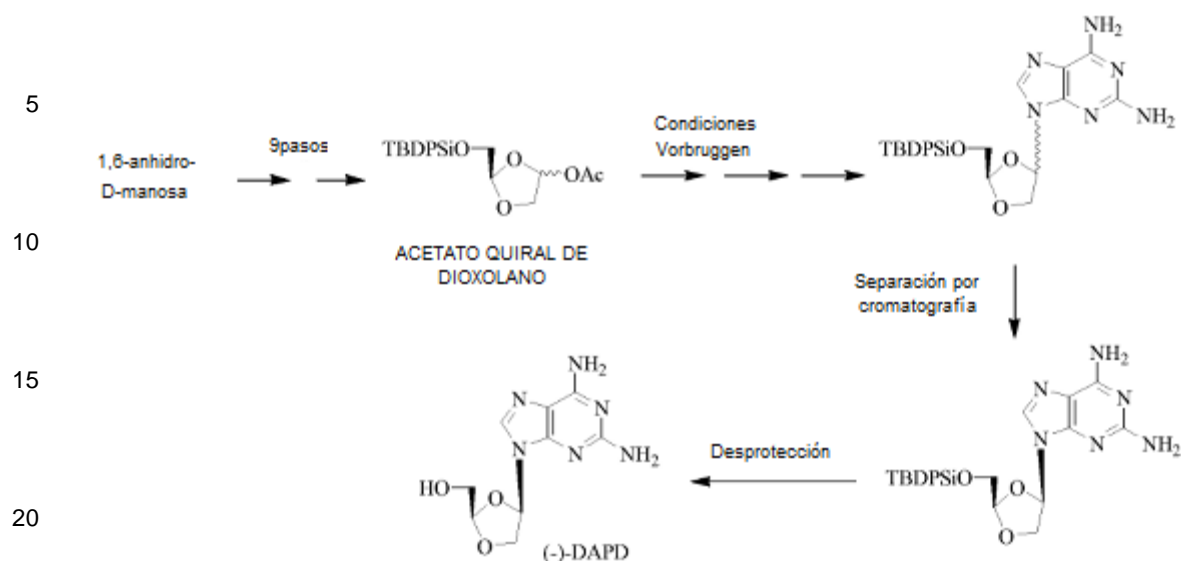
La debilidad de estos procedimientos, mostrados en el Esquema 3, es que involucran a la síntesis de un aldehído inestable y tienen pasos oxidantes difíciles.

Estados Unidos 5,179,104 otorgado a Chu y Schinazi, presenta un método para obtener nucleósidos puros de  $\beta$ -D-1,3-dioxolano por medio de una síntesis estereoespecífica (refiérase también a las patentes relacionadas de Estados Unidos números 5,925,643; 5,767,122; 5,444,063; 5,684,010; 5,834,474; y 5,830,898).

EP 0 515 156 otorgado a BioChem Pharma presenta un método para obtener los enantiómeros de los nucleósidos de 1,3-dioxolano utilizando una síntesis estereo selectiva que incluye la condensación de un intermediador de 1,3-dioxolano enlazado covalentemente a un auxiliar quiral con un ácido sililo de Lewis (refiérase además a las patentes relacionadas de Estados Unidos números 5,753,706 y 5,744,596).

Chu, et al., publicó una síntesis exterior específica de nucleósidos de  $\beta$ -D-1,3-dioxolano partiendo de 1,6-anhidromanosa (Chu, et al. Tet. Let., 1991, 32, 3791-3794). Alrededor del mismo tiempo, Thomas y Surber publicaron un artículo que describió que (i) una búsqueda completa de la literatura en la cromatografía quiral no reveló ningún ejemplo de separaciones de nucleósidos y que (ii) su trabajo parece ser la primera separación de enantiómeros de un nucleósido por medio de cromatografía quiral de líquidos de alto rendimiento. El nucleósido resuelto no fue un nucleósido de 1,3-dioxolano, y 4 de las 5 columnas quirales que se intentaron no funcionaron (Thomas, et al., J Chromat., 1991, 586, 265-270).

Kim et al. (Kim, et al. J. Med. Chem. 1993, 36 (1), 30-37) publicaron subsiguientemente un trabajo que presenta una síntesis asimétrica de enantiómeros  $\beta$ -D y  $\alpha$ -D de nucleósidos de pirimidina de 1,3-dioxolano a partir de 1,6-anhidro-D-manosa. La síntesis de (-)-DAPD fue descrita como un proceso de 13 pasos desde la 1,6-anhidro-D-manosa incluyendo una conversión de 9 pasos de 1,6-anhidro-D-manosa a un acetato quiral (Esquema 4).



Esquema 4

30 Después de acoplar al acetato bajo condiciones Vorbruggen y algunos pasos de purificación y de desprotección, se obtuvo (-)-DAPD en una producción modesta. Este proceso consume tiempo, es difícil e involucra pasos complicados de oxidación.

35 En 1992, Kim et al. (Kim, et al. J. Med. Chem. 1992, 35, 1987-1995) presenta la síntesis asimétrica de nucleósidos de 1,3-dioxolano-pirimidina y su actividad anti-VIH.

40 En 1993 Kim et al. (Kim, et al., J. Med. Chem. 1993, 36(5), 519-528) presentó nucleósidos L-.beta.-(2S,4S)- y L-.alfa.-(2S,4R)-dioxolanilos como agentes potenciales anti-VIH.

45 En 1992 Belleau et al. (Belleau, et al. Tet. Let. 1992, 33, 6949-6952) publicó una síntesis de estereo isómeros enantioméricamente puros de 2',3'-dideoxi-3-oxacitidina por medio de un proceso de 8 pasos utilizando ácido L-ascórbico como un auxiliar quiral. El ácido L-ascórbico fue utilizado para producir un conjunto de diaestereómeros que pueden ser separados. El uso del tetraacetato de plomo hace que este proceso sea inadecuado para elevar la escala. En 1992 Kim, et al., también publicó un artículo presentando como obtener (-)-L-β-dioxolano-C y (+)-L-β-dioxolano-T de 1,6-anhidro-L-β-gulopiranososa (Kim, et al., Tet. Let. 1992, 32(46), 5899-6902).

50 Liotta y Shinazi, en US 5,276,151, encontraron que 2-O-protegidos-5-O-acilados-1,3-dioxolanos racémicos podían acoplarse con bases de purina y pirimidina en la presencia de un ácido de Lewis que contienen titanio para generar predominantemente a los β-isómeros racémicos (refiérase además a WO 92/14729).

55 Jin et al. (Jin, et al. Tet. Asym. 1993, 4 (2), 211-214), divulga que los catalizadores de los ácidos Lewis juegan un rol crucial en la preparación de los nucleósidos de 1,3-dioxolano. TiCl<sub>4</sub> y SnCl<sub>4</sub> promueven la formación de nucleósidos de dioxolano con una ramecización en el acoplamiento de 2'-deoxi-3'-oxaribosidas enantioméricamente puras con N-acetilcitosina silitada. El uso del trimetilsililtriflato, el yoduro de trimetilsililo y el TiCl<sub>2</sub>(Oi-Pr)<sub>2</sub> de los ácidos de Lewis genera a nucleósidos de dioxolano enantioméricamente puros de citosina en una baja diaestereoselectividad.

60 Una síntesis asimétrica de nucleósidos de dioxolano fue reportada por Evans, et al. (Tet. Asym. 1993, 4, 2319-2322). Una reacción de D-manitol con BnOCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en la presencia de SnCl<sub>2</sub> en 1,2-dimetoxietano seguido por una oxidación de RuCl<sub>3</sub>/NaOCl generó un ácido cis- y trans-dioxolano-4-carboxílico, el cual fue convertido entonces a nucleósidos de D- y L-dioxolano por medio de reacciones de descarboxilación, acoplamiento y desprotección. Una ruta alterna a estos ácidos carboxílicos por medio de la reacción de BnOCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> con el ácido L-ascórbico también fue reportada en el estudio. El ácido carboxílico quiral también puede el preparado al reaccionar al ácido 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-(S)-carboxílico el cual está disponible comercialmente con un derivado protegido de hidroxil-acetaldehído tal como el benzoiloxiacetaldehído, bajo condiciones ácidas (refiérase a las patentes de Estados Unidos números 5,922,867 y 6,358,963).

Siddiqui, et al., divulga que el dioxolano de cis-2,6-diaminopurina puede ser desaminado selectivamente utilizando a la deaminasa de adenosina (Siddiqui, et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3 (8), 1543-1546).

5 Aunque la síntesis de los nucleósidos de dioxolano es posible utilizando los procesos descritos en la literatura, la química no es aplicable a la síntesis de (-)-DAPD a larga escala. Refiérase a Chu, et al. Tet. Let. 1991, 32, 3791-3794; Siddiqui, et al. Bioorg. Med. Chem. Let. 1993, 3, 1543-1546; Kim, et al. Tet. Let. 1992, 46, 6899-6902).

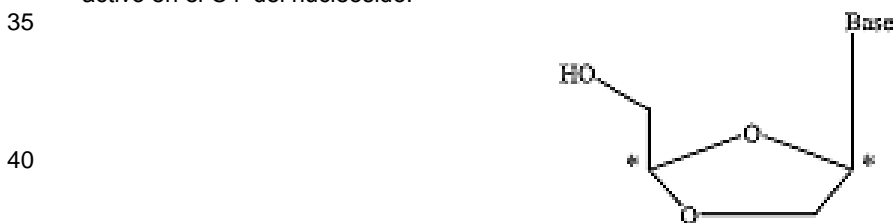
10 US 5,763,606 otorgado a Mansour et al. describe procesos para producir nucleósidos puros de 1,3-oxathiolano y 1,3-dioxolano por medio del acoplamiento de una base de purina o pirimidina sililada con un intermediador bicíclico (refiérase también a WO 94/29301).

15 US 6,215,004 otorgada a Painter et al. presenta el proceso para preparar 2-[R1C(O)OCH2]-1,3-dioxolanil-5-ona al reaccionar al ácido glicólico con unas et ál. de la fórmula (R1O)2CHR; un hemiacetal de la fórmula (R2O)(HO)CHR; o una de sus mezclas, donde R es -(CH2-O-C(O)R1), y R1 y R2 son independientemente alquilos, arilos, heteroarilos, heterocíclicos, alcarilos, alquilheteroarilos o alquilheterocíclicos o aralquilos, en la presencia de un ácido de Lewis, tal como un eterato dietílico de trifluoruro de boro (refiérase además a WO 00/09494).

20 WO 00/47759 y WO 01/58894 ambos otorgados a BioChem Pharma presentan procesos para la separación de los anómeros de una mezcla anomérica de análogos de dioxolano con una partícula COOR en la posición C4' antes del acoplamiento con una base purina o pirimidina. El proceso para resolver a los análogos de dioxolano para obtener a los dioxolanos tienen una β-L-configuración predominante, que involucra el uso de enzimas, específicamente las hidrolasas.

25 WO 03/062229 otorgado a Shire BioChem Inc. presenta un solo proceso de un portador de reacción para producir un análogo de nucleósidos de dioxolano al agregar un ácido de Lewis, y un agente de sililación y una base purina o pirimidina no sililada a un dioxolano. La publicación también describe un proceso para producir un compuesto de dioxolano al reaccionar a un compuesto dioxolano en un solvente en la presencia de DIB e I2, utilizando una fuente adecuada de energía.

30 La estereoquímica de los análogos de 2',3'-dideoxinucleósidos 3'-oxa-substituidos ("análogos de nucleósidos de dioxolano") pueden jugar un rol importante en su actividad biológica. La posición C1' de la ribosa en el nucleósido es un centro quiral porque el carbono está adherido a 4 partículas diferentes. Asimismo, existe un centro ópticamente activo en el C4' del nucleósido.

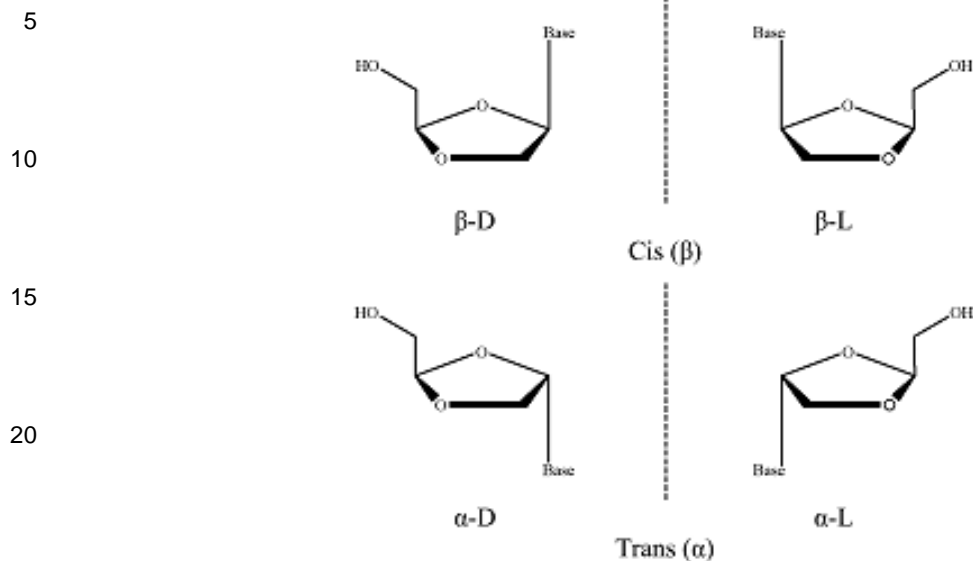


45 Tal como se muestra más adelante, los sustituyentes en los carbonos quirales (la base purina o pirimidina especificada y el CH2OH) de los nucleósidos 1,3-dioxolano pueden ser cis (en el mismo lado) o trans (en lados opuestos) en relación al sistema anular dioxolano. Para propósitos de consistencia, la misma designación estereoquímica es utilizada cuando la partícula metiloxi o la partícula base es reemplazada con otro grupo sustituyente. Los racematos cis y trans consisten de una pareja de isómeros ópticos. Por lo tanto, cada compuesto

50 tiene 4 isómeros ópticos. Los 4 isómeros ópticos son representados por las siguientes configuraciones (cuando orientan a la partícula de dioxolano en un plano horizontal de tal forma que la partícula -O-CH2- está en el frente): (1) cis, con ambos grupos "arriba", lo cual es una configuración β-cis (denominada β-D); (2) cis, con ambos grupos "abajo", lo cual es la configuración β-cis opuesta (denominada β-L); (3) trans con el sustituyente de C4' "arriba" y el sustituyente C1' "abajo"; y (4) trans con el sustituyente C4' "abajo" y el sustituyente C1' "arriba". Los 2 enantiómeros cis juntos son referidos como una mezcla racémica de β-enantiómeros, y los 2 enantiómeros trans son referidos como una mezcla racémica de α-enantiómeros. En general, es difícil separar u obtener de otra forma a los enantiómeros individuales de la configuración cis. Los 4 posibles estereo isómeros de nucleósidos de cis-1,3-dioxolano se ilustran a continuación:

60

65



Puesto que los estereoisómeros de los nucleósidos de dioxolano tienen usualmente diferentes actividades y toxicidades biológicas, obtener isómeros puros terapéuticamente activos se vuelve crucial. Frecuentemente, un estereoisómero es considerablemente más activo que el otro.

Chu *et al.* desarrolló métodos para la síntesis asimétrica de nucleósidos de dioxolano a partir de la lactona de D-manosa y L-gulónica para nucleósidos de D- y L-dioxolano, respectivamente (patente de Estados Unidos números 5,767,122, 5,792,773). Sin embargo, estos procesos involucraron muchos pasos y la mayoría de intermediarios necesitan ser purificados por medio de cromatografía de columna de gel de sílice (*refiérase a Kim et al. J. Med. Chem.* 1993, 36, 519-528).

Para preparar una cantidad suficientemente grande de una sustancia tipo medicamento de nucleósidos de dioxolano para ensayos clínicos, un 2-aciloximetil-5-oxo-1,3-dioxolano quiral ha sido utilizado como un intermediador clave. Esto fue preparado por medio de ciclización del ROCH<sub>2</sub>CHO o su acetal con ácido glicólico en la presencia de BF<sub>3</sub>, seguido por una separación de columnas en resina quiral o por medio de una resolución enzimática, las cuales son técnicas caras y difíciles.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad para procesos que sean efectivos en cuanto a costo y que sean estereoselectivos para producir isómeros biológicamente activos de nucleósidos de dioxolano.

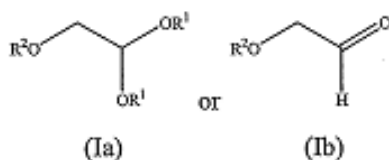
Es un objetivo de este invento el suministrar procesos nuevos y que sean efectivos en cuanto a costo para la síntesis de nucleósidos de dioxolano enantioméricamente puros.

### RESUMEN DEL INVENTO

Este invento incluye una ruta sintética y eficiente para nucleósidos de 1,3-dioxolano provenientes de precursores baratos, con la opción de introducir funcionalidades tal como fuese necesario. Los procesos permiten la preparación estereo selectiva del isómero biológicamente activo de estos compuestos.

En una sección de este invento, se suministra un proceso para preparar un nucleósido sustancialmente puro de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano, tal como  $\beta$ -D-DAPD que comprende:

- a) preparar u obtener un etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) o (Ib):



65

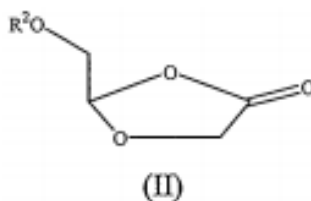


Donde:

cada  $R^1$  es independientemente un alquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterocíclico, un alcarilo, un alquilheteroarilo o un alquiheterocíclico o un aralquilo; y

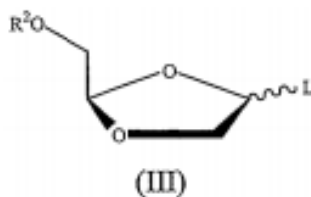
$R^2$  es cualquier grupo adecuado removible de tal forma que (1) sea fácilmente removible al final de la síntesis, (2) tenga una masa molecular baja para evitar cargar una masa grande durante el proceso, (3) sea comercialmente disponible y barata, (4) el éster correspondiente sea estable bajo condiciones de acetilación reductora, (5) la lactona subsiguiente sea soluble, y (6) después del acoplamiento, los anómeros correspondientes sean separados fácilmente, preferencialmente por medio de cristalización (por ejemplo, *iso*-butirilo o benzoilo de *p*-metoxi); y entonces,

b) ciclizando el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) o (Ib) con ácido glicólico, preferiblemente en la presencia de un ácido de Lewis, tal como  $BF_3 \cdot Et_2O$ , para obtener una lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II):



Y entonces,

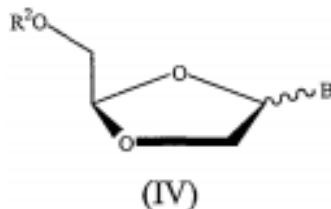
c) resolver la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura de la fórmula (III):



Donde:

L es un grupo adecuado que abandona, tal como un O-acilo, tal como OAc, un halógeno (F, Br, Cl o I), OMesilatos (OMs) y OToluatos (OTs), o similares; y entonces,

e) acoplar el D- o L-1,3-dioxolano sustancialmente puro de la fórmula (III) a una base purina o pirimidina protegida y/o activada o su derivado, tal como una 2,6-dicloropurina activada, para obtener una mezcla  $\alpha:\beta$  de nucleósidos de D- o L-1,3-dioxolano protegidos sustancialmente puros de la fórmula (IV):



Donde:

B es una base purina o pirimidina o su derivado; y entonces,

f) purificar la mezcla  $\alpha:\beta$  de los nucleósidos de D- o L-1,3-dioxolano protegidos sustancialmente puros de la fórmula (IV) para obtener un nucleósido de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano sustancialmente puro; y entonces

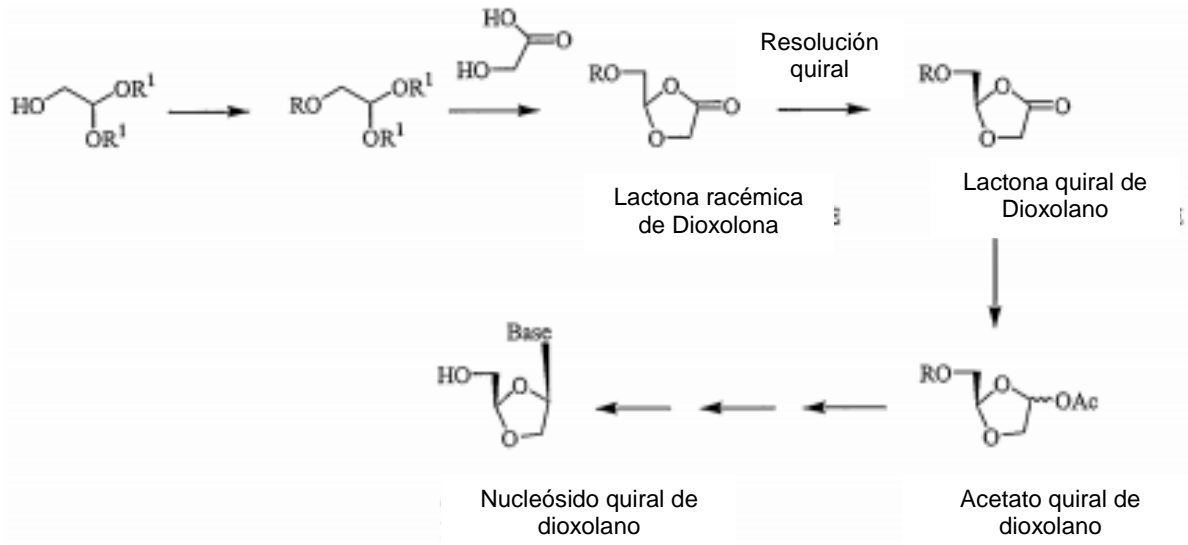
g) desproteger a los nucleósidos protegidos sustancialmente puros de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano, si fuese necesario, para obtener un nucleósido sustancialmente puro de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano.

En una sección de este invento, el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib). En una sección específica, el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia)

es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib) cuando  $R^2$  es benzoilo de *p*-metoxi.

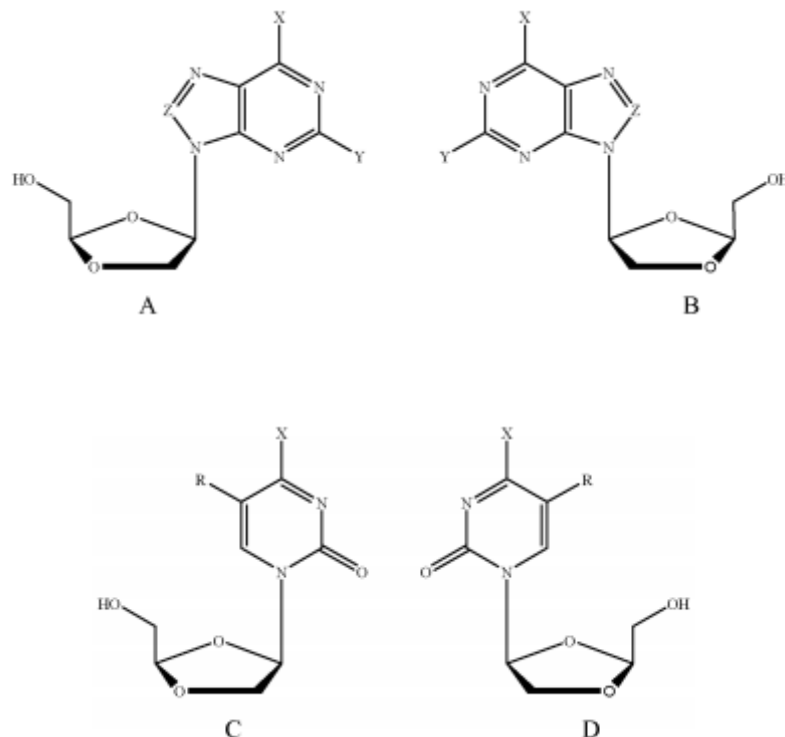
En otra sección de este invento, el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) no es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib). En una sección específica el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) no es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib) cuando  $R^2$  es *iso*-butirilo.

En una sección de este invento, la resolución de la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura se logra utilizando una cromatografía quiral. En una sección alterna de este invento, la resolución de la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura se logra utilizando una resolución enzimática.



Esquema 5

Por lo tanto, los procesos de este invento podrían ser utilizados para preparar compuestos de la fórmula a la D:



y su sales o ésteres farmacéuticamente aceptables, donde:

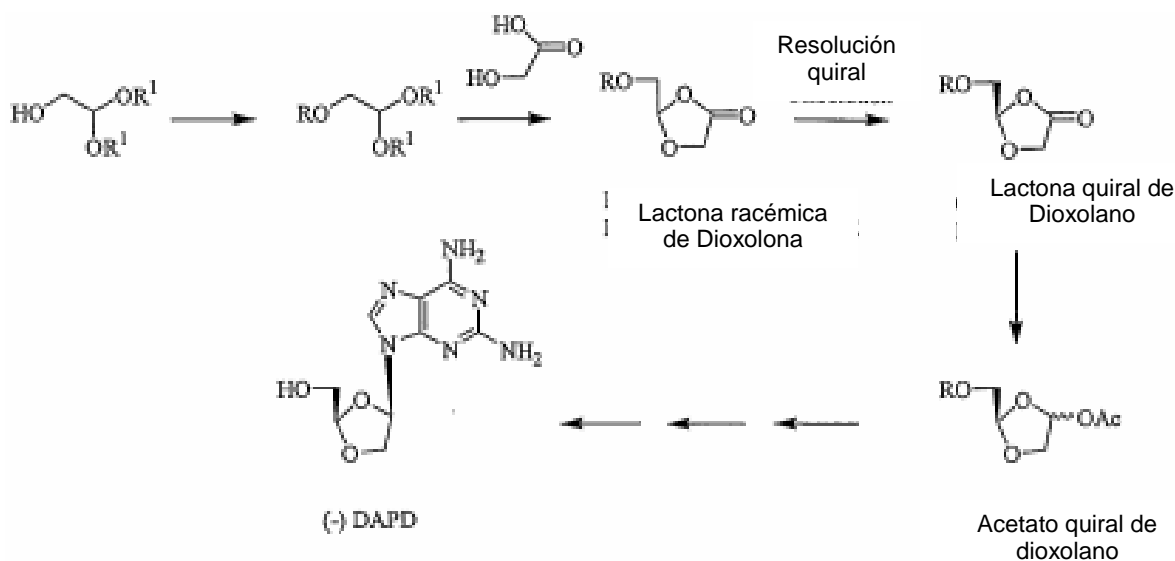
R es independientemente H, un halógeno (F, Cl, Br, I), OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR', NR'<sub>2</sub>, un alquilo inferior de C1-C4, CH<sub>3</sub>,CH=CH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>C=CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R', CONH<sub>2</sub>, CONHR', CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH=CHCO<sub>2</sub>H, CH=CHCO<sub>2</sub>R', CH=CHCl, CH=CHBr, o CH=CHI;

cada R' es independientemente un alquilo inferior de C1-C4;

Z es CH o C-X; y

cada X y Y son independientemente H, un halógeno (F, Cl, Br, I), OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR', NR'<sub>2</sub>, o CH<sub>3</sub>.

En una sección específica de este invento se suministra un proceso para preparar un β-D-DAPD sustancialmente puro. Refiérase al Esquema 6.



Esquema 6

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1 son cromatogramas típicos para los compuestos de este invento. La figura 1A es un cromatograma típico para la lactona de éster de butirilo (compuesto 1) la figura 1B es un cromatograma típico para el acetato de éster de butirilo (compuesto 3) la figura 1C es un cromatograma típico para la lactona de *p*-metoxibenzoilo (compuesto 11). La figura 1D es un cromatograma típico para la lactona de *p*-metoxibenzoilo (compuesto 11) utilizando el método optimizado de SFC. La figura 1E es un cromatograma típico para la lactona de benzoilo (compuesto 12). La figura 1F es un cromatograma típico para la lactona de benzoilo (compuesto 12) utilizando el método optimizado de SFC. Las figuras 1G-1J son cromatogramas típicos para la lactona de éster de iso-butirilo (compuesto 13). La figura 1K es un cromatograma típico para la lactona de éter de *t*-butil-difenil-sililo (compuesto 4) la figura 1L es un cromatograma típico para la lactona de éter de *t*-butil-difenil-sililo (compuesto 4) utilizando el método optimizado. La figura 1M es un cromatograma típico para DAPD. La figura 1N es un cromatograma típico para DAPD utilizando el método optimizado de SFC.

La figura 2 es una representación gráfica de un diagrama de fase teórica para la lactona de éter de *t*-butil-difenil-sililo (compuesto 4).

La figura 3 es una representación gráfica de la selectividad de ciertas enzimas microbianas para un enantiómero específico de los compuestos de este invento. Las figuras 3A y 3B muestran los resultados de la examinación de la lactona de éster de butirilo (compuesto uno) en relación a varias enzimas microbianas.

La figura 3C muestra los resultados de la examinación de la lactona de *p*-metoxibenzoilo (compuesto 11) en contra de varias enzimas microbianas. La figura 3D muestra los resultados de la examinación de la lactona de benzoilo (compuesto 12) en relación a varias enzimas microbianas. La figura 3E muestra los resultados de la examinación de la lactona de éster de *iso*-butirilo (compuesto 13) en relación a varias enzimas microbianas.

La figura 4 es una representación gráfica de la resolución microbiana de la lactona de éster de *iso*-butirilo (compuesto 13) en relación a las enzimas microbianas CMC 103669 y CMC 103661 utilizando varias concentraciones, amortiguadores, rangos de pH y temperaturas.

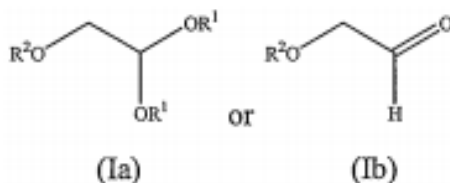
La figura 5 es un espectro <sup>1</sup>H NMR de 400 MHz para la lactona resuelta de éster de *iso*-butirilo (compuesto 13).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Este invento incluye rutas sintéticas eficientes para nucleósidos de 1,3-dioxolano provenientes de precursores baratos, con la opción de introducir funcionalidades tal como sea necesario. Estos procesos permiten la preparación estereoselectiva del isómero biológicamente activo de estos compuestos.

En una sección de este invento, se suministra un proceso para preparar un nucleósido sustancialmente puro de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano, tal como  $\beta$ -D-DAPD, que comprende:

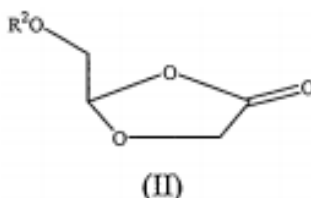
a) preparar u obtener un etanol esterificado de 2,2-dialkoxi de la fórmula (Ia) o (Ib):



Donde:

cada  $R^1$  es independientemente un alquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterocíclico, un alcarilo, un alquilheteroarilo o un alquiheterocíclico o un aralquilo; y  $R^2$  es cualquier grupo adecuado removible de tal forma que (1) sea fácilmente removible al final de la síntesis, (2) tenga una masa molecular baja para evitar cargar una masa grande durante el proceso, (3) sea comercialmente disponible y barato, (4) el éster correspondiente sea estable bajo condiciones de acetilación reductora, (5) la lactona subsiguiente sea soluble, y (6) después del acoplamiento, los anómeros correspondientes sean separados fácilmente, preferencialmente por medio de cristalización (por ejemplo, *iso*-butirilo o benzoilo de *p*-metoxi); y entonces,

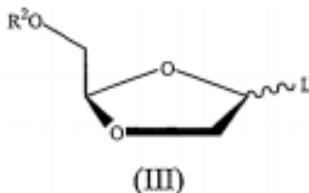
b) ciclizar el etanol esterificado de 2,2-dialkoxi de la fórmula (Ia) o (Ib) con ácido glicólico, preferiblemente en la presencia de un ácido de Lewis, tal como  $BF_3 \cdot Et_2O$ , para obtener una lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II):



Y entonces,

c) resolver la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura y entonces,

d) reducirla selectivamente con un agente reductor, tal como  $LiAlH(OtBu)_3$  y activar la D- o L- lactona quiral sustancialmente pura para obtener un D- o L-1,3-dioxolano sustancialmente puro de la fórmula (III):



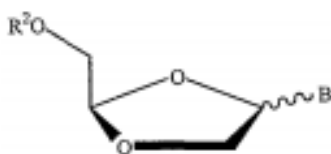
Donde:

L es un grupo adecuado que abandona, tal como un O-acilo, tal como OAc, un halógeno (F, Br, Cl o I), OMesilatos (OMs) y OTolatos (OTs), o similares; y entonces,

e) acoplar el D- o L-1,3-dioxolano sustancialmente puro de la fórmula (III) a una base purina o pirimidina

protegida y/o activada o su derivado, tal como una 2,6-dicloropurina activada, para obtener una mezcla  $\alpha:\beta$  de nucleósidos de D- o L-1,3-dioxolano protegidos sustancialmente puros de la fórmula (IV):

5



10

(IV)

Donde:

15

B es una base purina o pirimidina o su derivado;  
y entonces,

20

f) purificar la mezcla  $\alpha:\beta$  de los nucleósidos de D- o L-1,3-dioxolano protegidos sustancialmente puros de la fórmula (IV) para obtener un nucleósido de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano sustancialmente puro; y entonces  
g) desproteger a los nucleósidos protegidos sustancialmente puros de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano, si fuese necesario, para obtener un nucleósido sustancialmente puro de  $\beta$ -D- o  $\beta$ -L-1,3-dioxolano.

25

En una sección de este invento, el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib). En una sección específica, el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib) cuando  $R^2$  es benzoilo de *p*-metoxi.

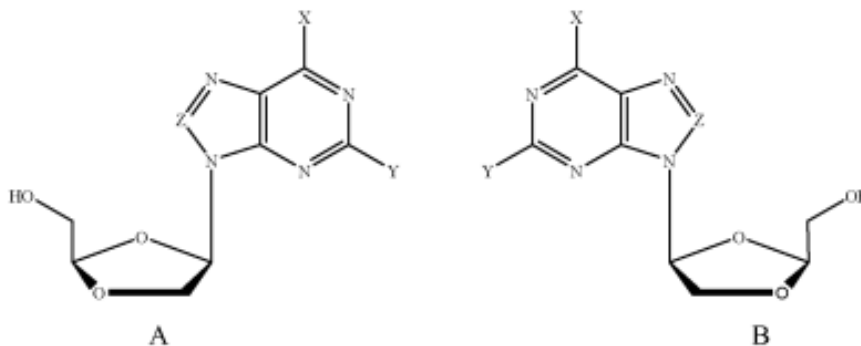
30

En una sesión de este invento, la resolución de la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura se logra utilizando cromatografía quiral. En una sección alterna de este invento, la resolución de la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura se logra utilizando una resolución enzimática.

35

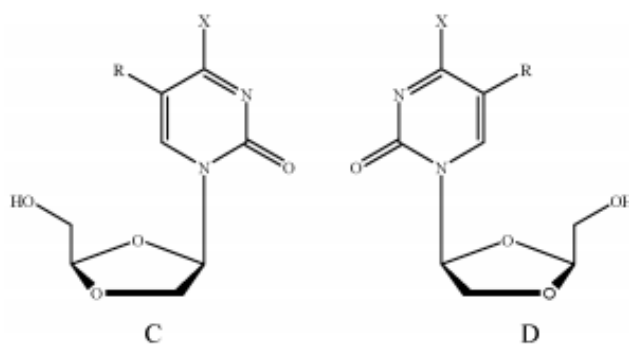
Por lo tanto, los procesos de este invento podrían ser utilizados para preparar compuestos de la fórmula A la D:

40



45

50



55

60

y su sales o ésteres farmacéuticamente aceptables, donde:

65

R es independientemente H, un halógeno (F, Cl, Br, I), OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR', NR'<sub>2</sub>, un alquilo inferior de C1-C4, CH<sub>3</sub>,CH=CH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>C=CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R', CONH<sub>2</sub>, CONHR', CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH=CHCO<sub>2</sub>H, CH=CHCO<sub>2</sub>R', CH=CHCl, CH=CHBr, o CH=CHI;

cada R' es independientemente un alquilo inferior de C1-C4;  
 Z es uno de CH o C-X; y  
 cada uno de X y Y son independientemente H, un halógeno (F, Cl, Br, I), OH, OR', OCH3, SH, SR', SCH3,  
 NH2, NHR', NR'2, o CH3.

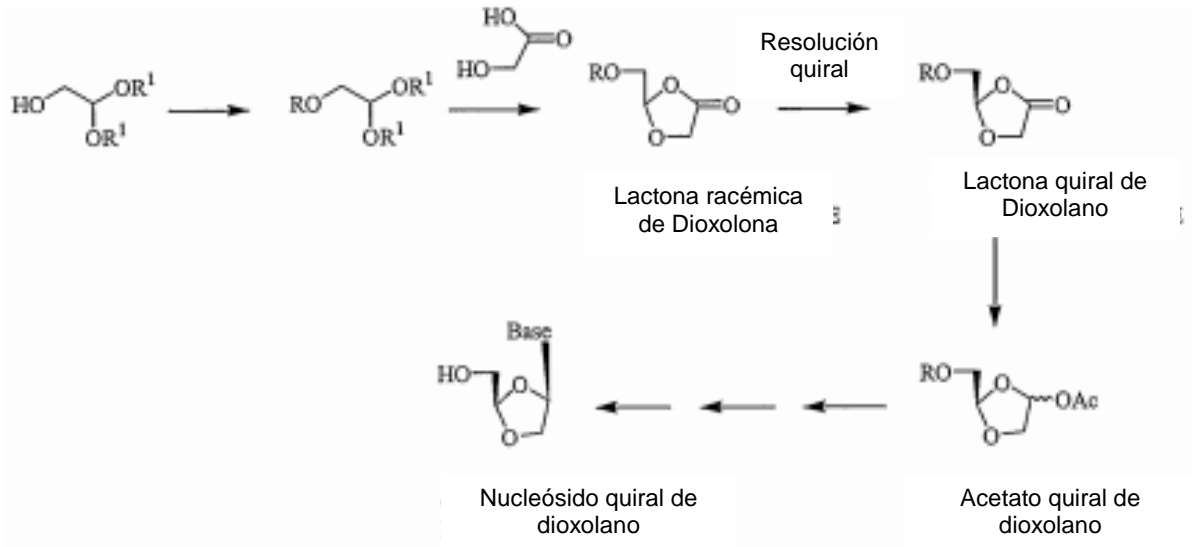
5

10

15

20

25



Esquema 5

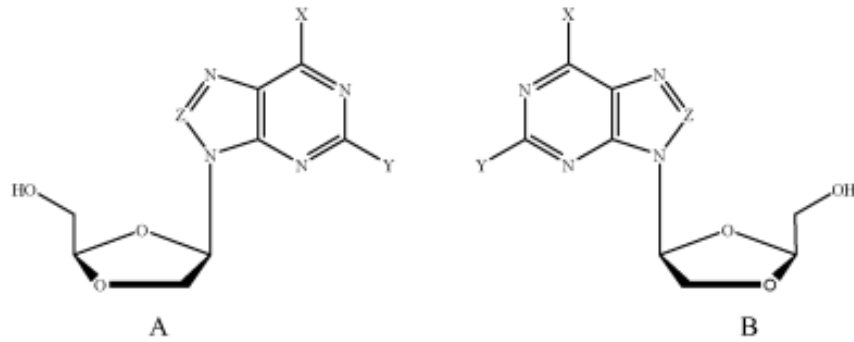
30

Por lo tanto, los procesos de este invento podrían ser utilizados para preparar compuestos de la fórmula a la D:

35

40

45

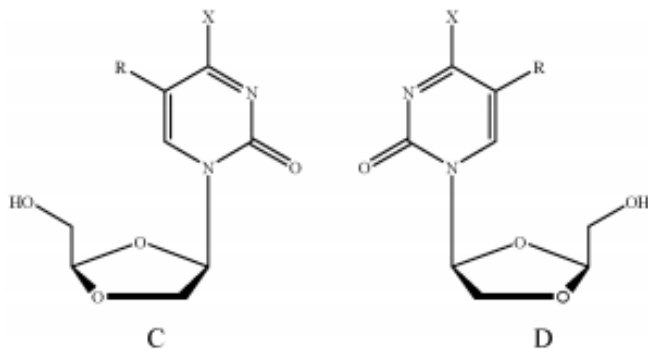


50

55

60

65



y sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables donde:

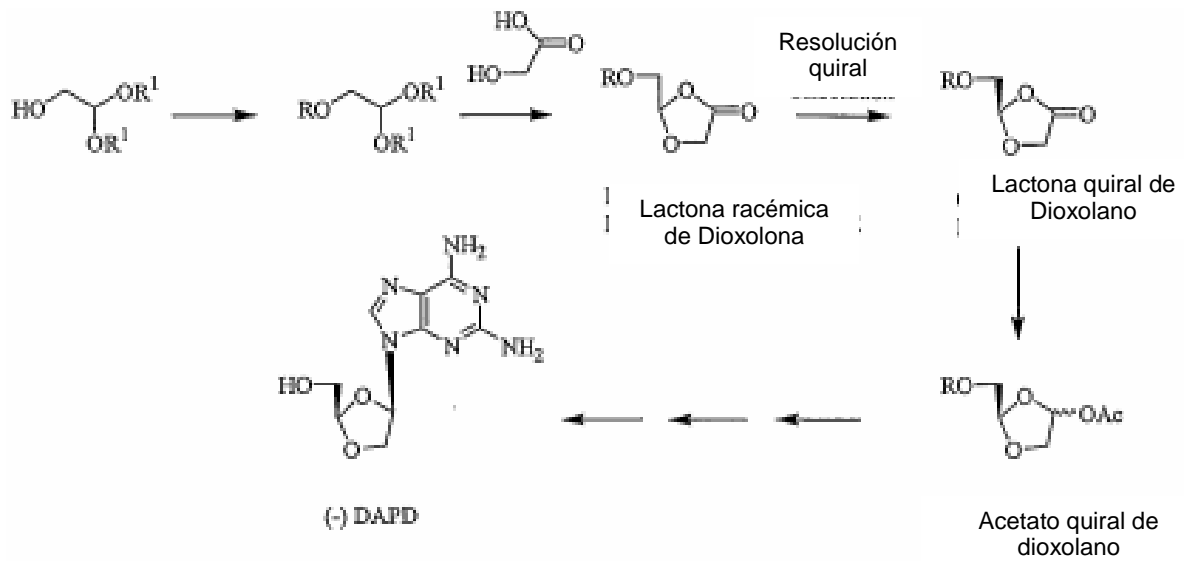
R es independientemente H, un halógeno (F, Cl, Br, I), OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR', NR'<sub>2</sub>, un alquilo inferior de C1-C4, CH<sub>3</sub>,CH=CH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>C=CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R', CONH<sub>2</sub>, CONHR', CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH=CHCO<sub>2</sub>H, CH=CHCO<sub>2</sub>R', CH=CHCl, CH=CHBr, o CH=CHI;

cada R' es independientemente un alquilo inferior de C1-C4;

Z es uno de CH o C-X; y

Y es independientemente H, un halógeno (F, Cl, Br, I), OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR', NR'<sub>2</sub>, o CH<sub>3</sub>.

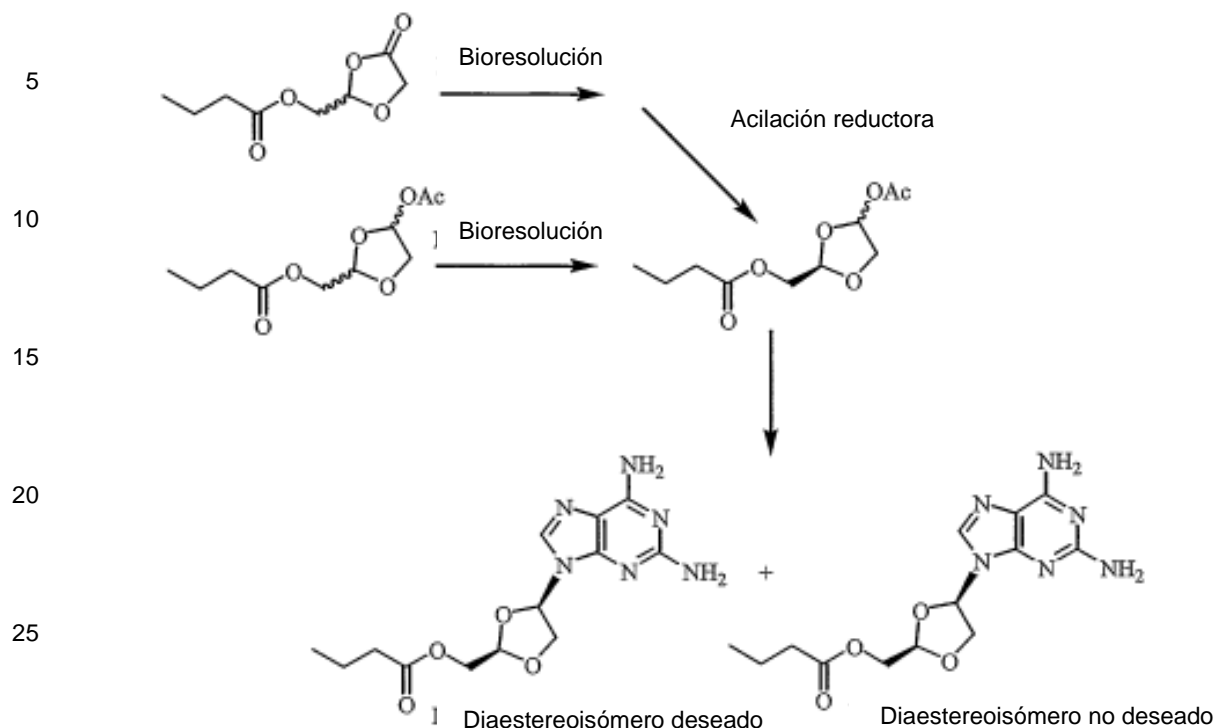
En una sección específica de este invento, se suministra un proceso para preparar un β-D-DAPD sustancialmente puro. Refiérase al Esquema 6.



Esquema 6

En una sección, el invento suministra procesos para la resolución de compuestos que pueden ser intermediadores en la síntesis de nucleósidos de 1,3-dioxolano, tales como el dioxolano de 1-β-D-2,6-diaminopurina (DAPD - 1-β-D-2,6-diaminopurine dioxolane).

En una sección, el invento se suministra un método biocatalítico para la síntesis de intermediadores de DAPD tal como se muestra en el Esquema 7.



**Esquema 7:** Rutas de ejemplo de DAPD

35 En una sección del invento, la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) es el éster de sec-butanoato (compuesto 13).

40 En una sección de este invento, si un (S)-enantiómero de la lactona de éster de butirato (compuesto 1 de la estructura más adelante) fuese deseada,



**Compuesto 1**

50 PPL es utilizado para la resolución quiral. Tal como fue descrito en los ejemplos, se identificó a PPL como la enzima más selectiva (22% de producción, 98% de ee), y se descubrió que deja al isómero del éster de (S)-butirato en una lámina enzimática completamente comercial de todas las enzimas comerciales disponibles y 200 enzimas microbianas.

55 Aunque en secciones generales, cualquier enzima efectiva puede ser utilizada, la Lipasa PS, las lipasas inmovilizadas *Pseudomonas* y la lipasa *M* fueron identificadas como enzimas selectivas que dejaron al isómero del éster de (R)-butirato, tal como fue descrito en los ejemplos. Se descubrió que la lipasa PS es una enzima eficiente que posee la enantio-preferencia requerida, dando un 22% de producción del 95% de ee del (R)- compuesto 1. Por lo tanto, en una sección alterna de este invento, si un (R)-enantiómero es deseado, entonces la lipasa PS, las lipasas inmovilizadas pseudomonas o la lipasa M es utilizada para la resolución quiral. En una sección específica, la enzima es la lipasa PS.

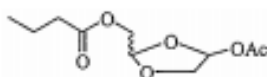
60 Aunque el invento no se ata a ninguna condición particular para su resolución, en una sección, la temperatura para la resolución es alrededor de 0 °C. En otra sección, la temperatura está entre -5 °C y 10 °C, o -2 °C y +5 °C o alrededor de -1 °C a alrededor de 1 °C. En otra sección, el monto del sustrato es de alrededor de 100 g/litro. El monto de sustrato puede variar, por ejemplo, desde 5 a 500, desde 20 a 200, desde 50 a 150, alrededor de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o más G/litros de amortiguador o G/litro del volumen total de la reacción. En una sección, el amortiguador es 1:1 de amortiguador tolueno, que puede ser a alrededor de un pH 6. En una sección específica, las condiciones para la resolución pueden ser de 0 °C, 100 g/litro de sustrato en 1:1 amortiguador de



tolueno de pH 6. Tal como se describe en los ejemplos, estas condiciones producen un 22%, un 95% de ee del (R)-compuesto 1 (E=5.3). Las condiciones también pueden variar ligeramente dentro de los parámetros experimentales para una resolución eficiente.

5 Cepas microbianas que resuelven a los compuestos pueden variar. En una sección, las cepas son de una especie de *Acinetobacter*. La examinación microbiana identificó 2 cepas (*Acinetobacter* y *Acinetobacter junii*) que dieron al (R)-butirato en un 80% de ee. Todas las enzimas comerciales disponibles y las 200 enzimas microbianas fueron examinadas para identificar una resolución eficiente del éster de butirato. La examinación microbiana reveló 2 cepas prometedoras (CMC 3419, *Acinetobacter* y CMC 3606, *Acinetobacter junii*) que dieron al (R)- butirato con un 80% de ee.

En una sección, cuando la resolución del acetato de éster de butirato (compuesto 3) de la estructura a continuación:

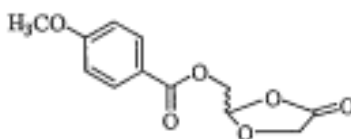


Compuesto 3

20 fuese deseada, la enzima utilizada es la lipasa PS. Una examinación completa de enzimas comerciales del compuesto 3 reveló que la mayoría de enzimas selectivas resuelven en el centro del acetato y no en el centro de butirato requerido. Sin embargo, la lipasa PS, la lipasa MY y la lipasa AY tenían una selectividad moderada, dejando a los isómeros de (R)-éster. Estas enzimas fueron de una selectividad similar a aquellas del compuesto 1. Investigaciones adicionales, revelaron que la lipasa PS es la más selectiva (E efectivo = 3.7). Asimismo, esta es una selectividad comparable a la resolución del compuesto 1 con la lipasa PS.

30 En una sección del invento, el paso de resolución ocurre en una etapa más temprana de la síntesis, es decir, en la etapa de la lactona.

En una sección, cuando la resolución del (S)-enantiómero de la lactona de *p*-metoxi-benzoilo, 4'-metoxibenzoato de 4-oxo-[1,3]dioxolan-2-ilmetilo (compuesto 11)



Compuesto 11

45 fuese deseado, entonces la Quirazima-L2 es utilizada para la resolución de la lactona. Un amplio rango de enzimas comerciales y microbianas fueron examinadas para identificar una resolución eficiente del compuesto 11. La Quirazima-L2 fue identificada como la enzima más selectiva dando un éster residual con un 39% de producción, >98% de ee del (S)-enantiómero.

En otra sección, cuando la resolución de la lactona de benzoilo, el benzoato de 4-oxo-[1,3]dioxolan-2-ilmetilo (compuesto 12)



Compuesto 12

60 fuese deseado, la enzima utilizada puede ser la Quirazima-L2. Una examinación de enzimas comerciales (10 enzimas) fue llevada a cabo para la lactona de benzoilo (compuesto 12). La Quirazima-L2 y la Proteasa-DS ácida fueron identificadas como agentes resolventes en la examinación. La Quirazima-L2 dio una selectividad comparable para las resoluciones de los compuestos 11 y 12. Una examinación limitada de enzimas comerciales para el compuesto 12 descubrió que la Quirazima-L2 fue nuevamente la enzima más eficiente.

65 En otra sección, cuando la resolución del (R)-enantiómero de la lactona de iso-butirilo, 4-oxo-[1,3]dioxolan-2-ilmetil-2'-metilpropanoato (compuesto 13)

**Compuesto 13**

es deseada, la enzima utilizada puede ser la Quirazima-L2. Una detección completa de enzimas comerciales y microbianas fue realizada para el Compuesto 13. La Quirazima-L2 fue identificada nuevamente como la enzima más selectiva. La configuración determinó que fue el (*R*)-enantiómero por medio de una correlación química. Estudios iniciales en un amortiguador MTBE dieron un éster residual con un 28% de producción, y un 92% de ee.

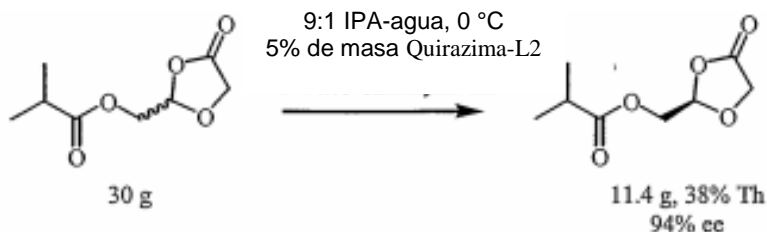
Una detección completa de enzimas comerciales para el compuesto 13 reveló que la Quirazima-L2, la lipasa PS, la proteasa DS ácida y la Quirazima-L 9 poseyeron una selectividad moderada, dejando al (*R*)-enantiómero como el éster residual. Una detección completa microbiana identificó cepas que fueron selectivas para cualquier enantiómero. Un microbio, el CMC 103869, dio una la zona con un ee de >95% al ejecutar la resolución a 10 °C.

En una sección, el sustrato fue el compuesto 13 (lactona de iso-butirilo). En otra sección, el sustrato es uno que genera una química corriente abajo más sencilla, por ejemplo, técnicas más sencillas de purificación. La Quirazima-L2 puede ser la enzima utilizada para la resolución. En una sección, la Quirazima-L2 puede dar la (*R*)- configuración del éster residual.

La reacción fue estudiada en un amortiguador MTBE, un amortiguador de tolueno y sistemas de 2-propanol-agua. Se encontraron problemas de estabilidad y selectividad con los sistemas de MTBE y de tolueno. Sin embargo, los resultados en el 2-propanol-agua fueron excelentes, dando un 38% de producción del compuesto 13 con un 94% de ee de un aporte de 30 g de racemato. Por lo tanto, en una sección, la resolución es realizada en 2-propanol-agua.

Se realizó un estudio de optimización. El proceso fue mejorado al utilizar un sistema monofásico de alcohol-agua como un solvente y utilizando la destilación Kugelrohr para purificar el producto. Por lo tanto, en una sección, el proceso involucra un sistema monofásico de alcohol-agua y destilación.

La bioresolución del compuesto 13 con Quirazima-L2 fue hecha a una escala mayor de 30 g a 200 gL<sup>-1</sup> en 2-propanol: agua (9:1) y dio 4-oxo-[1,3]dioxolan-2-il-metil-2'-metil-propanoato con una producción del 38%, un 94% de ee y un 90% de pureza química. Refiérase al Esquema 8.

**Esquema 8:** Condiciones identificadas para la bioresolución del Compuesto 13

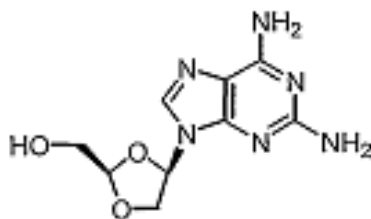
**[0075]** En contraste, la lactona de éter de sililo de t-butil-difenilo (compuesto 4) de la estructura a continuación:

**Compuesto 4**

fue determinada como un racemato verdadero. El diagrama de la fase para este compuesto fue construido lo cual reveló que la eutéctica fue de 77.5 por ciento de ee.

La *cis*-DAPD racémica fue examinada con varias enzimas conocidas por su actividad de acilación en la presencia de butirato de vinilo, pero se encontró que estas daban reacciones que no eran estereo selectivas. PeptiCLEC-BL y la lipasa AY dieron reacciones rápidas al butirato racémico deseado y por lo tanto podrían ser útiles para poner en una

forma regioselectiva y moderadamente un éster en el oxígeno. En una sección se utiliza a la PeptiCLEC-BL. En una sección separada, se utiliza a la lipasa AY.



Dioxolano de 1-β-D-2,6-Diaminopurina (DAPD - 1-β-D-2,6-Diaminopurine Dioxolane)

### Definiciones

Tal como se utiliza aquí, el término “sustancialmente puro”, “sustancialmente libre de”, “sustancialmente en la ausencia de” o “aislado” se refiere a una composición de nucleósidos que incluye por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95% o por lo menos el 99% al 100% de la masa, del enantiómero designado de aquel nucleósido. En una sección, el proceso produce compuestos que son sustancialmente libres de enantiómeros de la configuración opuesta.

El término alquilo, tal como se utiliza aquí, a menos que se especifique de otra forma, se refiere a un hidrocarburo lineal, ramificado o cíclico, primario, secundario, o terciario saturado de C1 a C10, y específicamente incluye a metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye a grupos alquilo sustituidos y no sustituidos. Las partículas con las cuales el grupo alquilo pueden ser sustituidas o seleccionadas de un grupo que consiste de hidroxilos, aminos, alquilaminos, arilaminos, alcoxis, ariloxis, nitros, cianos, ácidos sulfónicos, sulfatos, ácidos fosfóricos, fosfatos, o fosfonatos, ya sean protegidos o no protegidos tal como sea necesario, tal como es conocido para aquellas personas con conocimiento en la industria, por ejemplo, tal como lo enseña Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en la Síntesis Orgánica), John Wiley y Sons, Segunda Edición, 1991, incorporado a este documento por referencia.

El término alquilo inferior, al cómo es utilizado aquí, a menos que se especifique de otra forma, se refiere a un grupo alquilo lineal, ramificado o si fuese apropiado cíclico (por ejemplo, ciclopropilo) saturado de C1 a C4 incluyendo las formas sustituidas y no sustituidas. A menos que se declare específicamente de otra forma en esta aplicación, cuando el alquilo es una partícula adecuada, se prefiere al alquilo inferior. Similarmente, cuando el alquilo o el alquilo inferior es una partícula adecuada, el alquilo o el alquilo inferior no sustituido es preferido.

El término arilo, tal como es utilizado en este documento, y a menos que se especifique de otra forma, se refiere a fenilo, bifenilo, o naftilo. El término incluye partículas sustituidas y no sustituidas. El grupo arilo puede ser sustituido con una o más partículas seleccionadas de un grupo que consiste de bromo, cloro, flúor, yodo, hidroxilo, amino, alquilaminos, arilaminos, alcoxis, ariloxis, nitros, cianos, ácidos sulfónicos, sulfatos, ácidos fosfóricos, fosfatos o fosfonatos, ya sean protegidos o no protegidos tal como sea necesario, tal como es conocido para aquellas personas con conocimiento en la industria, por ejemplo tal como lo enseña Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en la Síntesis Orgánica), John Wiley y Sons, Segunda Edición, 1991.

El término alcarilo o alquilarilo se refiere a un grupo alquilo con un sustituyente arilo. El término aralquilo o arilalquilo se refiere a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

El término halo, tal como es utilizado en este documento, incluye a bromo, cloro, flúor y yodo.

El término heteroátomo, tal como es utilizado en este documento, se refiere al oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo.

El término acilo se refiere a un éster de ácido carboxílico en el cual la partícula que no es carbonila del grupo éster es seleccionada de un alquilocíclico, alquilo inferior o alcoxilalquilo lineal o ramificado incluyendo a metoximetilos, aralquilo incluyendo a bencilos, a ariloxialquilo tales como fenoximetilos, arilo incluyendo a fenilos sustituidos opcionalmente con halógenos, alquilo C1 a C4 o alcoxis C1 a C4, ésteres sulfonatos tales como sulfonilos de alquilo o de aralquilo incluyendo a metanosulfonilos, el éster de mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilos sustituidos, trialkilsililos (por ejemplo, dimetil-*t*-butilsililos) o difenilmetilsililos. Los grupos arilos en los ésteres comprenden óptimamente a un grupo fenilo. El término “acilo inferior” se refiere a un grupo acilo en el cual la partícula que no es carbonila es un alquilo inferior.

El término “protegidos” tal como se utiliza en este documento, a menos que se defina de otra forma, se refiere a un

grupo que es agregado a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para prevenir su reacción adicional o para otros propósitos. Una amplia variedad de grupos protectores de oxígeno y de nitrógeno son conocidos para aquellas personas en la industria de la síntesis orgánica.

5 El término base purina o pirimidina incluye, pero no se limita a, las adeninas, las N<sup>6</sup>-alquil-purinas, la N<sup>6</sup>-acilpurinas (donde acilo es C(O)(alquilo, arilo, alquilarilo, o arilalquilo), N<sup>6</sup>-bencilpurinas, N<sup>6</sup>-halopurinas, N<sup>6</sup>-vinilpurinas, purinas N<sup>6</sup>-acetilénicas, purinas de N<sup>6</sup>-acilos, purinas de N<sup>6</sup>-hidroxialquilos, purinas de N<sup>6</sup>-tioalquilos, N<sup>2</sup>-alquilpurinas, N<sup>2</sup>-alquil-6-tiopurinas, timinas, citosinas, 5-citosinas, 5-metilcitosinas, 6-azapirimidinas, incluyendo 6-aza-citosinas, 2-y/o 4-mercapto-pirimidinas, uracilos, 5-halouracilos, incluyendo 5-fluorouracilos, C<sup>5</sup>-alquilpirimidinas, C<sup>5</sup>-bencilpirimidinas, C<sup>5</sup>-halopirimidinas, C<sup>5</sup>-vinilpirimidinas, pirimidinas C<sup>5</sup>-acetilénicas, pirimidinas de C<sup>5</sup>-acilos, purinas de C<sup>5</sup>-hidroxialquilos, C<sup>5</sup>-amido-pirimidinas, C<sup>5</sup>-cianopirimidinas, C<sup>5</sup>-nitro-pirimidinas, C<sup>5</sup>-aminopirimidinas, N<sup>2</sup>-alquilpurinas, N<sup>2</sup>-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinilo, 5-azauracililo, triazolopiridinilos, imidazolo-piridinilos, pirrolopirimidinilos, y pirazolopirimidinilos. Las bases purinas incluyen, pero no se limitan a, la guanina, la adenina, la hipoxantina, la 2,6-diaminopurina, la 2-(Br, F, Cl o I)-purina opcionalmente con un sustituyente incluyendo un grupo amino o carbonilo en la posición 6, y 6-(Br, Cl, o I)-purina opcionalmente con un sustituyente incluyendo un grupo amino o carbonilo en la posición 2. Grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno en la base pueden ser protegidos tal como fuese necesario o deseado. Grupos protectores adecuados son bien conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria, e incluyen a los grupos trimetilsililo, dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo, *t*-butildifenilsililo, tritilo, alquilo y a grupos acilos tales como acetilos y propionilos, metanosulfonilos, y *p*-toluenosulfonilos.

El término heteroarilo o heteroaromático, tal como se utiliza en este documento, se refiere a un aromático que incluye por lo menos un sulfuro, un oxígeno, un nitrógeno o un fósforo en el anillo aromático. El término heterocíclico se refiere a un grupo cíclico no aromático donde existe por lo menos un heteroátomo, tal como el oxígeno, el azufre, el nitrógeno o el fósforo en el anillo. Ejemplos no limitantes de grupos heteroarilos y heterocíclicos incluyen a furilos, furanilos, piridilos, pirimidilos, tienilos, isotiazolilos, imidazolilos, tetrazolilos, pirazinilos, benzofuranilos, benzotiofenilos, quinolilos, isoquinolilos, benzotienilos, isobenzofurilos, pirazolilos, indolilos, isoindolilos, bencimidazolilos, purinilos, carbazolilos, oxazolilos, tiazolilos, iso-tiazolilos, 1,2,4-tiadiazolilos, isooxazolilos, pirrolilos, quinazolinilos, cinolinilos, ftalacinilos, xantínulos, hipoxantínulos, tiofenos, furanos, pirrolos, isopirrolos, pirazoles, imidazoles, 1,2,3-triazoles, 1,2,4-triazoles, oxazoles, isoxazoles, tiazoles, isotiazoles, pirimidinas o piridacinas, y pteridinilos, aziridinas, tiazoles, isotiazoles, 1,2,3-oxadiazoles, tiacinas, piridinas, piracinas, piperacinas, pirrolidinas, oxaziranass, fenacinas, fenotiaccinas, morfolinilos, pirazolilos, piridacínulos, piracínulos, quinoxalínulos, xantínulos, hipoxantínulos, pteridinilos, 5-azacitidinilos, 5-azauracililos, triazolopiridinilos, imidazolopiridinilos, pirrolopirimidinilos, pirazolopirimidinilos, adeninas, N<sup>6</sup>-alquilpurinas, N<sup>6</sup>-bencilpurinas, N<sup>6</sup>-halopurinas, N<sup>6</sup>-vinilpurinas, purinas N<sup>6</sup>-acetilénicas, purinas de N<sup>6</sup>-acilos, purinas de N<sup>6</sup>-hidroxialquilos, purinas de N<sup>6</sup>-tioalquilos, timinas, citosinas, 6-azapirimidinas, 2-mercaptopirimidinas, uracilos, N<sup>5</sup>-alquilpirimidinas, N<sup>5</sup>-bencilpirimidinas, N<sup>5</sup>-halopirimidinas, N<sup>5</sup>-vinilpirimidina, pirimidinas N<sup>5</sup>-acetilénicas, pirimidinas de N<sup>5</sup>-acilos, purinas de N<sup>5</sup>-hidroxialquilos, y purinas de N<sup>6</sup>-tioalquilos e isoxazolilos. El grupo hetero aromático puede ser sustituido opcionalmente tal como fue descrito anteriormente para el arilo. El grupo heterocíclico o heteroaromático puede ser sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados de halógenos, haloalquilos, alquilos, alcoxis, hidroxis, derivados de carboxilos, amidos, aminos, alquilaminos, dialquilaminos. El heteroaromático puede ser parcialmente o totalmente hidrogenado tal como fuese deseado. Un ejemplo no limitante la dihidropiridina que puede ser utilizada en vez de la pirimidina. Grupos funcionales de oxígeno y de nitrógeno en el grupo heterocíclico o heteroarilo pueden ser protegidos tal como fuese necesario o deseado. Grupos protectores adecuados son bien conocidos por aquellas personas con conocimiento en la industria, e incluyen a grupos trimetilsililos, dimetilhexilsililos, *t*-butildimetilsililos, y *t*-butildifenilsililos, tritilos o tritilos sustituidos, grupos alquilos, grupos acilos tales como acetilos y propionilos, metanosulfonilos y *p*-toluenilsulfonilos.

Estas bases purinas o pirimidinas, heteroaromáticos y heterociclos pueden ser sustituidos con grupos alquilos o anillos aromáticos, enlazados por medio de enlaces simples o dobles o fusionados al sistema anular heterociclo. La base purina, la base pirimidina, el heteroaromático o el heterociclo pueden ser enlazados a la partícula del azúcar a través de cualquier átomo disponible, incluyendo el nitrógeno anular y el carbono anular (produciendo un nucleósido C).

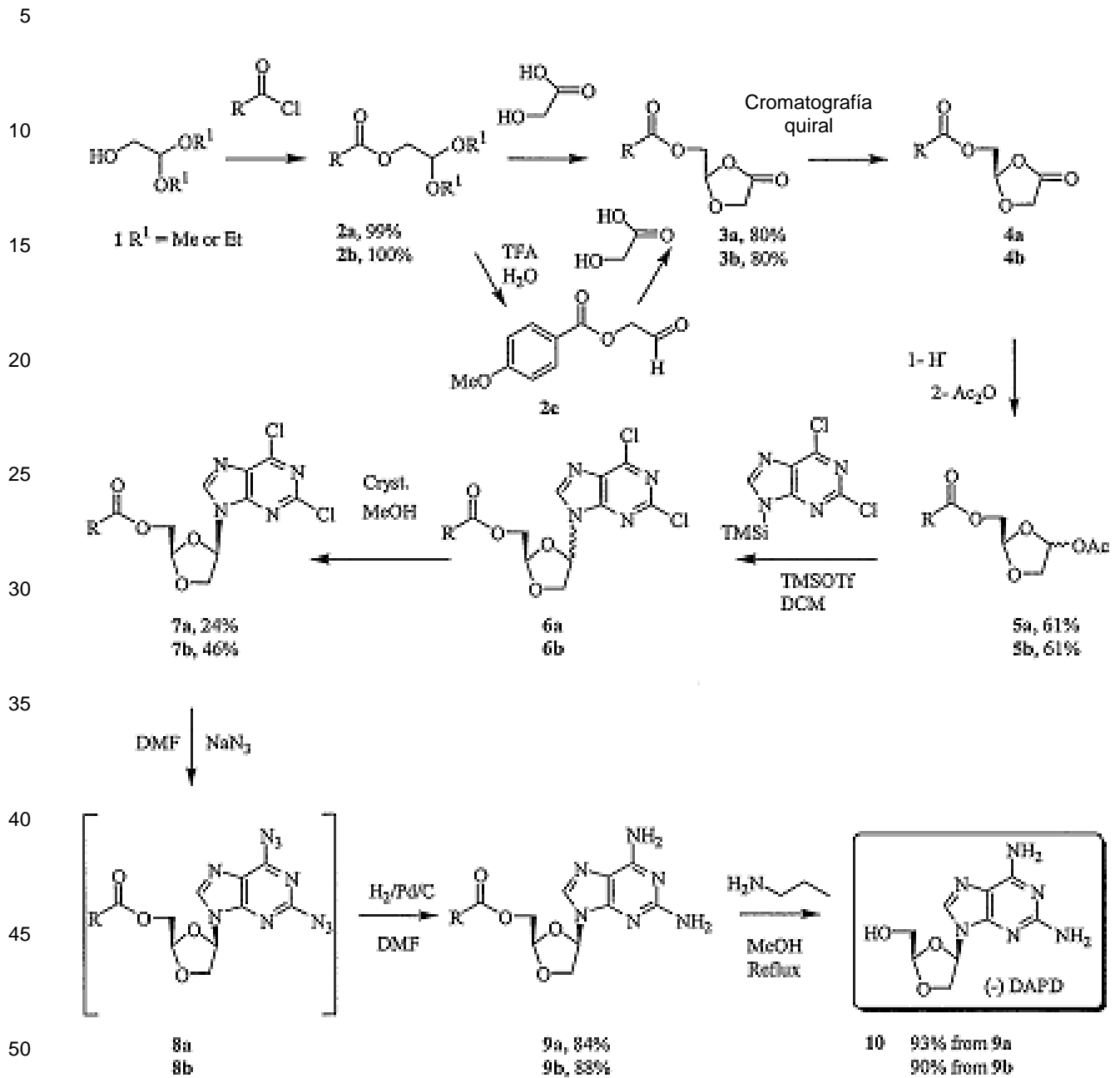
Abreviaciones utilizadas a lo largo de este documento incluyen a ee: exceso enantiomérico para el material (s) o el producto (p) de inicio; c: conversión; y E: constante de enantioselectividad.

### **Descripción detallada de los pasos del proceso**

60

65

a, R = -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 b, R = p-MeO-Ph-



Producción total de 10 5a, 11.4%  
5b, 22.2%

Esquema 9

60 Inicialmente un 2,2-dialcoxi-etanol (1) fue esterificado con el correspondiente cloruro ácido en producciones  
 65 cuantitativas. En el caso del éster de *iso*-butirilo (2a), la ciclización de la lactona de dioxolano correspondiente (3a),  
 fue afectada con un ácido glicólico en la presencia de un ácido de Lewis (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) con un 80% de producción. Sin  
 embargo, bajo las mismas condiciones, el éster de benzoato de p-metoxi (2b) generó la lactona correspondiente con  
 una producción y pureza baja. Se obtuvieron mucho mejores resultados en un procedimiento de 2 pasos en el cual  
 el acetal fue hidrolizado primero al aldehído correspondiente (2c), el cual fue sujeto entonces a condiciones similares  
 de ciclación, generando a la lactona correspondiente (3b) con una producción del 80% en forma de un sólido. Las

lactonas fueron resueltas por medio de cromatografía quiral<sup>13</sup>. La reducción selectiva de las lactonas quirales (**4a** y **4b**) con LiAlH(OtBu)<sub>3</sub> y el tratamiento subsiguiente con anhídrido acético generaron los acetatos correspondientes (**5a** y **5b**) en producciones razonables, después de la purificación por medio de cromatografía de columnas de destellos. El acoplamiento con la 2,6-dicloropurina bajo las condiciones de Vobruggen generaron mezclas crudas de anómeros α:β de los nucleósidos correspondientes (**6a** y **6b**). El éster de *iso*-butirato fue purificado primero por medio de cromatografía de columnas y luego fue cristalizado desde MeOH para generar al anómero β puro (**7a**) en un 24% de producción. El nucleósido del éster de benzoato de metoxi no requirió cromatografías, y fue purificado por medio de cristalización desde MeOH para generar al anómero β puro (**7b**) con un 46% de producción. Los cloros fueron reemplazados con grupos aminos en un procedimiento de 2 pasos por medio de un tratamiento con una azida de sodio y luego hidrogenación. Los intermedios correspondientes (**9a** y **9b**) fueron aislados y descritos completamente. La remoción de los grupos protectores se logró con *n*-butilamina con reflujos de MeOH para generar a (-)-DAPD (10) con una producción del 93% y del 90% respectivamente.

Las producciones generales totales de las lactonas quirales correspondientes (**5a** y **5b**) fueron: del 11.4 por ciento para el *iso*-butirato y del 22.2 por ciento para el benzoato de *p*-metoxi.

## EJEMPLOS

Los puntos de derretimiento fueron determinados en capilares de vidrio abiertos al utilizar un aparato Melt-Temp II con un termómetro digital. El espectro <sup>1</sup>H-NMR fue registrado a 400 MHz con un espectrómetro Varian XL-400. Se realizaron evaporaciones bajo presión reducida utilizando un evaporadora rotatoria Buchi a 40 °C a menos que se indique de otra forma. Las soluciones fueron secadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido. Se realizó un TLC en placas recubiertas de vidrio (0.25 milímetros) con el gel de sílice 60F254 (E. Merck, Darmstad). La cromatografía de columnas de destellos fue realizada con el gel de sílice 60 (230-400 mesh, E. Merck, Darmstad). Análisis elementales fueron realizados por Atlantic Microlab (Atlanta, GA). Se realizaron Espectros de Masa de Alta Resolución (HRMS - High Resolution Mass Spectra) por Analytical Instrument Group Inc. (Raleigh, NC).

**Análisis de Cromatografía de Gases:** Muestras fueron preparadas al disolver 1 mg de la muestra por 1 ml de THF, u otro solvente adecuado. Una inyección de un volumen de un microlitro fue utilizada. Las muestras fueron separadas utilizando 30m de columna capilar de HP-5 (5% de siloxano reticulado de ME de PH), Hewlett Packard parte número 19091J-413. La temperatura de entrada fue establecida a 200 °C, y la temperatura del horno de la siguiente forma: 35 °C durante un minuto, elevándose a 250 °C a 12. 5 °C/minuto, manteniéndose a 250 °C durante 1.8 minutos. La temperatura del detector de ionización de la llama se estableció a 250 °C. El gas portador fue nitrógeno establecido a un flujo nominal de 8.0 mililitros/minuto.

### Análisis HPLC:

**Método A:** Columna: Chiralpak AD-RH, 150 x 4.6 mm. Fase móvil: Metanol. Gradiente: Isocrático. Caudal: 0.5 mililitros/minuto. Tiempo de ejecución: 30 minutos. Detección: ultravioleta a 280 nm.

**Método B:** Columna: Aquasil C18, 150 x 4.6 mm. Fase móvil: solvente A: Acetonitrilo, solvente B: 50 mmol de NH<sub>4</sub>OAc, 0.1% de AcOH en agua. Gradiente: tiempo: 0 minutos, A: 1%, B: 99%; tiempo: 17 minutos, A: 50%, B: 50%, entonces isocrático. Caudal: 1.0 ml/minuto. Tiempo de ejecución: 30 minutos. Detección: ultravioleta a 290 nm.

**Método C:** Columna: Chiralpak AD, 250 x 4.6 mm. Fase móvil: metanol. Gradiente: Isocrático. Caudal: 0.8 mililitros/minuto. Tiempo de ejecución: 20 minutos. Detección: ultravioleta a 254 nm.

### Ejemplo 1

#### Éster de 2,2-dimetoxi-etilo de ácido isobutírico

#### Éster de 2,2-dietoxi-etilo de ácido 4-metoxi-benzoico

A una solución bien agitada de 2,2-dietoxi- o 2,2-dimetoxi-etanol (1.100 mmol), DMAP (61 mg, 0.5 milimoles) y Et<sub>3</sub>N (16 ml, 11.64 g, 115 mmol) en EtOAc o éter de *tert*-butilmetilo (50 ml) a 0 °C se le agregó lentamente el cloruro ácido correspondiente (105 mmol). Después de agitarse durante 16 horas a la temperatura del cuarto la mezcla de la reacción fue diluida con EtOAc (50 ml), y lavada exitosamente con: (c) NaHCO<sub>3</sub> (2 x 100 ml), salmuera (2 x 100 ml), secada, filtrada y evaporada para generar a:

Éster de 2,2-dimetoxi-etilo de ácido isobutírico (2a, 99%) en forma de un líquido amarillo que fue utilizado en el próximo paso sin ninguna purificación adicional. GC (Rt = 5.24 min., 98%); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.57 (1H, t, J = 5.2, (MeO)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-), 4.11 (2H, d, J = 5.2, (MeO)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-), 3.40 (6H, s, CH<sub>3</sub>O-), 2.60 (1H, m, OCOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.54 (6H, d, J = 6.8, OCOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

El éster de 2,2-dietoxi-etilo de ácido 4-metoxibenzoico (2b, 100%) en forma de un jarabe que fue utilizado en el próximo paso sin purificaciones adicionales. GC (Rt = 13.7 min, 99%); <sup>1</sup>H-NMR (CMCl<sub>3</sub>) δ: 7.98 (2H, d, J = 9.0, ArH), 6.89 (2H, d, J = 9.0, ArH), 4.79 (1H, t, J = 5.6, (EtO)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-), 4.28 (2H, d, J = 5.6, (EtO)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-), 3.82 (3H, s,

CH<sub>3</sub>O-), 3.73 (2H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-), 3.59 (2H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-), 1.22 (6H, t, J = 6.9, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-).

### Ejemplo 2

#### 5 Éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2-ilo de ácido 4-metoxibenzoico

A una solución bien agitada del acetal correspondiente (**2a**, 30 mmol) y ácido acético de  $\alpha$ -hidroxi (3.42 gramos, 45 mmol) en acetonitrilo (30 ml) a 0 °C se agregó lentamente BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (6.38 g, 5.70 ml, 45 mmol). La solución se dejó que repose a la temperatura del cuarto durante la noche mientras se agitaba. La solución fue dividida entre EtOAc (150 ml) y (c) NaHCO<sub>3</sub> (150 ml). La solución orgánica fue lavada sucesivamente con (c) NaHCO<sub>3</sub> (150 ml), salmuera (2 x 150 ml), secada, filtrada y evaporada para generar:

Éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2-ilo de ácido isobutírico (**3a**, 80%) en forma de un jarabe incoloro. GC (R<sub>t</sub> = 7.89 min., 95%); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.83 (1H, s, H-2), 4.35-4.20 (4H, m, H-5, H-5' and -CH<sub>2</sub>OCO-), 2.62 (1H, m, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-), 1.19 (6H, d, J = 7.0, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-).

Masa calculada para C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub> (M + 1)<sup>+</sup>: 189.0763. Encontrado: (H.R.F.A.B.M.S.): 189.0763.

### Ejemplo 3

#### 20 Éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2-ilo de ácido 4-metoxibenzoico

Una solución de éster de 2,2-dietoxi-etilo de ácido 4-metoxibenzoico (**2b**, 7.5 gramos, 28 mmol) en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (75 ml) fue tratada con TFA (16.7 g, 11.3 ml, 140 mmol) y agua (7.5 g, 7.5 ml, 28 mmol). La solución homogénea fue agitada durante 3.5 horas a la temperatura del cuarto hasta que el GC mostró una reacción completa. La solución fue concentrada al vacío a 40 °C y luego diluida con hexano y concentrada al vacío varias veces para remover los vestigios de TFA. El producto, éster de 2-oxo-etilo de ácido 4-metoxibenzoico (**2c**, 5.9 gramos, 28 mmol, 100%) fue aislado en forma de un sólido amorfo y fue utilizado en el siguiente paso sin ninguna purificación adicional. GC (R<sub>t</sub> = 11.0 min, 95%); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.72 (1H, s, HCO-), 8.06 (2H, d, J = 8.8, ArH), 6.95 (2H, d, J = 8.8, ArH), 4.87 (2H, s, HCOCH<sub>2</sub>O-), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

Una solución bien agitada de aldehído crudo (**2c**, 5.9 gramos, 28 mmol) y un ácido acético de  $\alpha$ -hidroxi (5.2 gramos, 68 mmol) en DME (100 ml) a 0 °C se le agregó lentamente BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (12.3 g, 11.0 ml, 85 mmol). A la solución se le dejó que repose a la temperatura del cuarto durante la noche agitándose. La solución fue dividida entre EtOAc (150 ml) y (c) NaHCO<sub>3</sub> (150 ml). La solución orgánica fue lavada sucesivamente con (c) NaHCO<sub>3</sub> (150 ml), salmuera (2 x 150 ml), secada, filtrada y evaporada para generar un jarabe. El jarabe fue tratado con DME (15 ml) y una precipitación sólida. Después de agitarse durante 30 minutos, el sólido fue filtrado para generar éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (**3b**, 5.7 gramos, 23 mmol, 80%) en forma de un sólido blanco granular; GC (R<sub>t</sub> = 14.7 min, 99%); mp: 61 - 63 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.97 (2H, d, J = 9.2, ArH), 6.91 (2H, d, J = 9.2, ArH), 5.95 (1H, t, J = 3.0, H-2), 4.57 (1H, dd, J = 3.0 and J = 12.6, -CH<sub>2</sub>OCO-), 4.50 (1H, dd, J = 3.0 y J = 12.6, -CH<sub>2</sub>OCO-), 4.41 (1H, d, J = 15.0, H-5), 4.31 (1H, d, J = 15.0, H-5), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, C, 57.14; H, 4.80. Encontrado: C, 57.40; H, 4.93.

### Ejemplo 4

#### 45 Éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (**4a**).

El éster racémico de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2-ilo de ácido isobutírico (**3a**) fue resuelto por medio de cromatografía<sup>13</sup> quiral para generar 2 fracciones correspondientes a cada uno de los enantiómeros. Ambas fracciones fueron jarabes incoloros. La primera fracción correspondió al enantiómero R (**4a**, éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico); HPLC (método A, R<sub>t</sub> = 7.80 min., 100%); [ $\alpha$ ]<sub>D20</sub> = 20.20° (c 0.25, MeOH). La 2<sup>a</sup> fracción correspondió al enantiómero S (éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2(S)-ilo de ácido isobutírico); HPLC (método A, R<sub>t</sub> = 9.30 min., 100%); [ $\alpha$ ]<sub>D20</sub> = -14.40° (c 0.25, MeOH).

### 55 Ejemplo 5

#### Éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-Metoxibenzoico

El éster racémico de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (**3b**) fue resuelto por medio de cromatografía<sup>7</sup> quiral para generar 2 fracciones correspondientes a cada uno de los enantiómeros. Ambas fracciones fueron sólidos blancos. La primera fracción correspondió al enantiómero R (**4b**, éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico); mp: 76 - 78 °C; HPLC (método A, R<sub>t</sub> = 13.59 min., 99%); [ $\alpha$ ]<sub>D20</sub> = 12.20° (c 0.25, MeOH). La 2<sup>a</sup> fracción correspondió al enantiómero S (éster de metilo de 4-oxo-[1,3]-dioxolan-2(S)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico); mp: 76 - 78 °C; HPLC (método A, R<sub>t</sub> = 20.76 min., 99%); [ $\alpha$ ]<sub>D20</sub> = -13.50° (c 0.25, MeOH).

**Ejemplo 6****Éster de metilo de 4-acetoxi-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (5a).****5 Éster de metilo de 4-acetoxi-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (5b).**

A una solución bien agitada de la lactona correspondiente (**4a o 4b**, 15 milimoles) en THF seco (45 ml) a -10 °C, se agregó lentamente 1.0 M de una solución de LiAlH(OtBu)<sub>3</sub> en THF (19.5 ml, 19.5 mmol) durante un periodo de 20 minutos, manteniendo la temperatura entre -15 °C y -10 °C. La reacción fue seguida por un GC y fue agitada durante 30 minutos a la temperatura del cuarto (desaparición completa del material de inicio). La solución fue enfriada nuevamente a -10 °C y se agregó DMAP (0.92 g, 7.50 mmol) en una porción seguido por la adición en forma de gotas de Ac<sub>2</sub>O (15.3 g, 14.20 ml, 150 mmol). La reacción fue agitada aún más durante una hora a -15 °C y entonces durante la noche a la temperatura del cuarto. La solución fue enfriada a -15 °C y neutralizada con MeOH (40 ml). Después de agitarse durante 20 minutos a la temperatura del cuarto, la reacción fue concentrada al vacío a un jarabe rojo que fue purificado por medio de cromatografía de columnas de destellos (250 g de sílice, hexano:EtOAc 3:1) para generar:

Éster de metilo de 4-acetoxi-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (**5a**, 61%) en forma de un jarabe amarillo. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) muestra una mezcla de casi 1:1 de anómeros, δ: 6.40 (d, J = 3.8) y 6.37 (d, J = 3.8) que corresponde a H-4 α y a H-4 β; 5.41 (t, J = 3.7) y 5.32 (t, J = 3.7) que corresponde a H-2 α and H-2 β.

El éster de metilo de 4-acetoxi-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (**5b**, 61%) en forma de un jarabe amarillo. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) muestra una mezcla de casi 1:1 de anómeros, δ: 6.44 (dd, J = 2.1 y J = 4.2) y 6.37 (d, J = 4.0) que corresponden a H-4 α y H-4 β; 5.54 (t, J = 3.6) y 5.45 (t, J = 4.0) que corresponden a H-2 α y H-2 β.

**Ejemplo 7****Éster de metilo de 4(R)-(2,6-dicloro-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (7a).****30 Éster de metilo de 4(R)-(2,6-dicloro-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (7b).**

Una suspensión de 2,6-dicloropurina (1.27 g, 6.73 mmol), sulfato de amonio (38 mg, 0.29 mmol) y 1,1,1,3,3,3-hexametilidisilazano (8.45 g, 11.04 ml, 52.3 mmol) fue recalentada hasta hacer reflujos durante 2.5 horas. La solución resultante fue enfriada a la temperatura ambiente haciendo que se precipite un sólido grueso. Los sólidos fueron re-disueltos por medio de la adición de diclorometano seco (14.9 mililitros). La solución fue enfriada entonces -10 °C, y una solución del acetato correspondiente (**5a o 5b**, 8.6 milimoles) en diclorometano seco (10 ml) fue agregada lentamente durante un periodo de 20 minutos, manteniendo la temperatura entre -10 °C y -5 °C. Entonces, se agregó lentamente TMSOTf (2.5 g, 2.08 ml, 10.4 mmol) durante un periodo de 20 minutos. Se dejó a la reacción que repose durante la noche y agitándose a la temperatura del cuarto. La solución fue diluida con diclorometano (120 ml) y neutralizada con agua (150 ml). La capa orgánica fue separada y lavada sucesivamente con agua (150 ml), (c) NaHCO<sub>3</sub> (2 x 150 ml), agua (2 x 150 ml), secada, filtrada y evaporada a un jarabe (**6a** crudo) o un sólido amarillo (**6b** crudo).

El **6a** crudo fue purificado aún más por medio de cromatografía de columnas (hexano:AcOEt 4:1) para generar a **6a** en forma de una mezcla 1.2:1 β:α de anómeros, de acuerdo a <sup>1</sup>H-NMR. La muestra fue cristalizada lentamente desde MeOH (10 ml) para generar al éster de metilo de 4(R)-(2,6-dicloropurin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (**7a**, 24%) en forma de un sólido blanco y caracterizado como el anómero β; mp: 145 - 147 °C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -47.67° (c 0.25, MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.52 (1H, s, H-8), 6.55 (1H, d, J = 4.9, H-4), 5.34 (1H, t, J = 5.7, H-2), 4.58-4.30 (4H, m, -CH<sub>2</sub>COO-, H-5 y H-5'), 2.61 (1H, m, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-), 1.19 (3H, d, J = 6.8, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-), 1.14 (3H, d, J = 6.8, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-).

Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: C, 43.23; H, 3.91; N, 15.51. Encontrado: C, 43.39; H, 3.91; N, 15.58.

El **6b** crudo fue lavado primero con hexano caliente para generar al éster de metilo de 4-(2,6-dicloro-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-il de ácido 4-metoxi-benzoico (**6b**) en forma de un sólido amarillo. <sup>1</sup>H-NMR indicó una mezcla de 2:1 de anómeros β:α. Esta mezcla fue cristalizada lentamente desde MeOH (100 ml) para generar al éster de metilo de 4(R)-(2,6-dicloro-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (**7b**, 46%) en forma de un sólido amarillo y caracterizado como el anómero β; mp: 154 - 156 °C; HPLC (método B, Rt = 20.73 min.); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -53.80° (c 0.25, MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (Cl<sub>3</sub>CD) δ: 8.41 (1H, s, H-8), 7.91 (2H, d, J = 8.5, ArH), 6.92 (2H, d, J = 8.5, ArH), 6.53 (1H, d, J = 4.8, H-4), 5.44 (1H, bs, H-2), 4.70-4.30 (4H, m, H-5, H-5' y -CH<sub>2</sub>OCO-), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

Masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M + 1)<sup>+</sup>: 425.0419. Encontrado (H.R.F.A.B.M.S.): 425.0420.

**Ejemplo 8****Éster de metilo de 4(R)-(2,6-diazido-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (8a).**



**Ester de metilo de 4(R)-(2,6-diacido-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (8b).**

A una solución bien agitada del nucleósido de dicloropurina correspondiente (**7a** o **7b**, 2.9 milimoles) en DMF seco (13.5 mililitros) se agregó NaN<sub>3</sub> (390 mg, 6.0 mmol). A la mezcla de la reacción se dejó que repose a la temperatura del cuarto agitándose durante 4 horas. La mezcla fue filtrada por medio de diatomita para generar una solución de:

Éster de metilo de 4(R)-(2,6-diacido-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (**8a**) o éster de metilo de 4(R)-(2,6-diacido-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo (**8b**) en DMF (70 ml) que fue utilizado en el próximo paso sin ninguna purificación adicional.

**Ejemplo 9****Éster de metilo de 4(R)-(2,6-diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (9a).****Éster de metilo de 4(R)-(2,6-diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico**

La solución de la reacción previa (**8a** u **8b**) fue hidrogenada (aparato Parr, 50 psi) a la temperatura del cuarto, en la presencia de un 10% de Pd/C (200 mg) durante la noche. La mezcla fue filtrada a través de diatomita y la torta de filtro fue lavada con DMF adicional.

En el caso de **8a**, la solución fue concentrada hasta secarse y purificarse por medio de cromatografía de columnas Cl<sub>3</sub>CH:MeOH 9:1 para generar un sólido blanco que fue cristalizado desde *iso*-propanol para generar al éster de metilo de 4(R)-(2,6-diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (**9a**, 84% después de la corrección por la presencia de una molécula de 2-propanol que se co-cristalizaba) en forma de un sólido blanco; mp: 143 - 145 °C; [α]<sub>D20</sub> = -56.45° (c 0.25, MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.84 (1H, s, H-8), 6.33 (1H, dd, J = 1 y J = 5.1, H-4), 5.29 (3H, t, J = 3.2, H-2 y NH<sub>2</sub>), 4.70 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 4.50 (1H, dd, J = 1 y J = 9.0, H-5), 4.33 (2H, d, J = 3.2, -CH<sub>2</sub>COO-), 4.23 (1H, dd, J = 5.1 y J = 9.0, H-5'), 2.60 (1H, m, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-), 1.18 (3H, d, J = 6.2, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-), 1.14 (3H, d, J = 7.2, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCOO-).

Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>•2-propanol: C, 50.25; H, 6.85; N, 21.98. Encontrado: C, 50.16; H, 6.84; N, 21.92.

En el caso de **8b**, la solución fue concentrada a un volumen final de 15 ml al vacío a 60 °C. La solución fue diluida con agua (150 ml) y después de algunos minutos se precipitó un sólido. El producto fue filtrado, lavado con agua, secado durante la noche a 50 °C al vacío para generar al éster de metilo de 4(R)-(2,6-diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo (**9b**, 88%) en forma de un sólido amorfo; HPLC (método B, Rt = 15.41 min.); [α]<sub>D20</sub> = -95.75° (c 0.25, MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.82 (2H, d, J = 8.8, ArH), 7.80 (1H, s, H-8), 7.02 (2H, d, J = 8.8, ArH), 6.77 (2H, bs, MH<sub>2</sub>), 6.23 (1H, dd, J = 5.5 y J = 1.6, H-4), 5.85 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.36 (1H, t, J = 3.3, H-2), 4.65 (1H, dd, J = 9.4 y J = 1.6, H-5), 4.46 (2H, d, J = 3.4, -CH<sub>2</sub>OCO-), 4.26 (1H, dd, J = 9.4 y J = 5.5, H-5'), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

Masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 387.1417. Encontrado (H.R.F.A.B.M.S.): 387.1417.

**Ejemplo 10****4(R)-[-(2,6-Diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-il]-metanol, [10, (-)-DAPD] proveniente de 9 a.**

Una solución de éster de metilo de 4(R)-(2,6-diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido isobutírico (**9a**, 100 mg, 0.31 milimoles) y n-butilamina (0.45 g, 0.62 ml, 6.2 mmol) en MeOH (10 ml) fue calentada para hacer reflujo durante 4 horas. La reacción fue enfriada a la temperatura ambiente y concentrada al vacío para generar un sólido que fue triturado con éter de metilo de terc-butilo infiltrado para generar un sólido que fue cristalizado de EtOH: agua (1:4.5 ml) para generar a (-)-DAPD (**10**, 75 mg, 0.29 mmol, 93%) en forma de un sólido blanco; mp: 237 - 239 °C (lit.<sup>2</sup> mp: 236 - 237 °C); HPLC (método C, Rt = 8.7 min., Una muestra auténtica de (-)-DAPD demostró Rt = 8.7 min. y una muestra de (+) DAPD demostró Rt = 6.0 min.); DAPD; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.80 (1H, s, H-8), 6.74 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 6.20 (1H, d, J = 5.5, H-4), 5.84 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.16 (1H, t, J = 6.3, OH), 5.03 (1H, t, J = 2.9, H-2), 4.42 (1H, d, J = 9.7, H-5), 4.18 (1H, dd, J = 9.7 y J = 5.5, H-5'), 3.58 (2H, dd, J = 6.3 y J = 2.9, -CH<sub>2</sub>OH).

Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: C, 42.86; H, 4.80; N, 33.32. Encontrado C, 42.88; H, 4.79; N, 33.32.

**Ejemplo 11****4(R)-[-(2,6-Diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-il]-metanol, [10, (-)-DAPD] proveniente de 9b.**

Una suspensión de éster de metilo de 4(R)-(2,6-diamino-purin-9-il)-[1,3]-dioxolan-2(R)-ilo de ácido 4-metoxibenzoico (**9b**, 1.0 g; 6 mmol) y n-butilamina (3.7 g, 5.0 ml, 50 mmol) en MeOH (25 ml) fue calentada hasta hacer reflujo durante 4 horas. La reacción fue concentrada al vacío para generar un sólido amarillo que fue suspendido en Cl<sub>3</sub>CH a la temperatura del cuarto y filtrada, para generar a (-) DAPD (**10**, 590 mg, 2.3 mmol, 90%) en forma de un sólido blanco. Las propiedades físicas fueron idénticas a la muestra de (-)-DAPD obtenida anteriormente.

**Ejemplo 12****Determinación de la constante de enantioselectividad**

5 La enantioselectividad de una reacción simple de hidrólisis puede ser caracterizada por el valor E (C.S Chen, C.J. Sih, Y. Fujimoto y G. Girdaukus, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 7294). Esto representa numéricamente la tasa de las constantes de especificidad del catalizador para los 2 enantiómeros. El valor E permite una comparación directa de la selectividad catalizadora, aún si las reacciones han ido a conversiones diferentes.

10 Para calcular el valor E, la magnitud de la conversión y la pureza óptica del material restante de inicio y/o el producto de hidrólisis son necesarios. Si  $ee_s$  y  $ee_p$  son conocidos, una persona puede calcular la conversión (c) utilizando la ecuación 1. Si solamente  $ee_s$  o  $ee_p$  es conocido, c se determina a la terminación de la hidrólisis y puede ser utilizado para calcular a E (ecuación 2).

15 Ecuación 1:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

20 Ecuación 2:

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]}$$

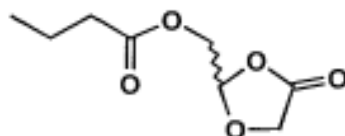
25

**Abreviaturas:**

30  $ee$  = exceso enantiomérico para el material (s) o el producto (p) de inicio  
 c = conversión  
 E = constante de enantioselectividad

**Ejemplo 13**

35



40 **Compuesto 1**

**Desarrollo analítico para el compuesto 1**

45

Un ensayo quiral fue requerido para el compuesto 1. Una separación de línea base fue lograda por medio de GC quiral utilizando la columna Chirasil DEX CB. Refiérase a la **figura 1A**.

**Condiciones GC:**

50

	Columna:	Chirasil DEX CB
	Dimensiones:	25m x 0.25mm
	Programa de la temperatura:	140 °C durante 10 minutos y luego a 200 °C a
15 °C/minuto		
55	Gas portador:	Helio @ 20 psi
	Detección:	FID @ 200°C
	Tiempos de retención:	<b>1 - 7.46 min (R)-enantiómero</b> <b>2 - 7.70 min (S)-enantiómero</b>

**Examinación enzimática para el compuesto 1**

60

*Lipasas*: para cada matraz de centelleo se agregó 50 µl del compuesto 1, MTBE (5 mL) y 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 (5 mL), seguido de 25 µg de enzimas. Los matraces fueron agitados en una incubadora configurada a 30 ° C. Las porciones fueron removidas periódicamente y se expusieron a ensayos por medio de TLC (50% EtOAc/heptano) y GC quiral.

65

*Proteasas y Estereasas:* Tal como se mencionó anteriormente, excepto que el solvente de la reacción fue 5 ml, 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7 u 8 sin MTBE. Las reacciones de las proteasas ácidas fueron realizadas a un pH de 3 utilizando 0.1 M de solución ácida láctica [pepsina, proteasa ácida A (Newlase A), y la proteasa ácida II (Newlase II)].

5 En algunos casos, 25 mg, 50% de la masa de la enzima dio reacciones extremadamente rápidas y de esa forma un 100% de conversión fue alcanzada antes de que se pudieran realizar ensayos significativos. En estos casos, las reacciones fueron realizadas nuevamente con el monto apropiado de enzimas para dar una tasa razonable de reacción (usualmente el 5% de la masa). Las enzimas que requirieron cargas más pequeñas fueron la Quirazima-L2, -E1 y-E2, todas las CLECs, estereasa de colina, la estereasa cándida (Altus), la PPL, la lipasa PS y la lipasa AK.

10 2 conjuntos de condiciones fueron utilizados para la examinación del compuesto racémico 1, dependiendo de si la enzima usada fue una lipasa o una proteasa/estereasa. Para las hidrólisis de lipasas catalizadas, la reacción solvente fue 1:1 MTBE:50 mM de amortiguador de fosfato de potasio de pH 7. Para las hidrólisis de proteasas y estereasas catalizadas, las reacciones fueron ejecutadas en 50 mM de amortiguador de fosfato de potasio, pH 7 u 8 (o pH 3 para proteasas ácidas) sin co- solventes inmiscibles. Las reacciones fueron ejecutadas en un baño agitador a 30 °C y seguido por un TLC, con los valores de ee<sub>s</sub> determinados por un análisis GC (columna Chirasil Dex-CB).

15 El producto alcohólico de las hidrólisis del éster de butirato parece ser inestable puesto que algunos lugares nuevos en el TLC fueron producidos durante las reacciones. Por lo tanto, sin un ensayo quiral para el posible producto, conversiones aproximadas fueron estimadas a partir del análisis TLC.

20 Los resultados de las examinaciones se muestran en las tablas a continuación. La tabla 1 muestra las enzimas que dejaron selectivamente al pico uno en el ensayo quiral del butirato, mientras que la tabla 2 muestra las enzimas que dejaron selectivamente el pico 2 en el ensayo quiral del butirato. Vale mencionar que pareció existir un número muy grande de enzimas que generaron una hidrólisis no - estereoselectiva del compuesto uno, lo cual indicó que el sustrato es inestable bajo las condiciones de reacción. Cuando una reacción de control fue realizada la cual no contenía enzimas, la hidrólisis aún ocurrió. Investigaciones adicionales de la estabilidad del sustrato se describen en este documento.

30

**Tabla 1:** Enzimas que dejan selectivamente el pico 1 en el ensayo de ee del butirato

35

Enzima	Tiempo	ee <sub>s</sub>	Conversión aproximada
Pseudomonas de lipasa inmovilizada SAWA	6h	92%	>50%
	O/N	-	No S.M
Lipasa M	6h	26%	
	O/N	91%	~75%
Lipasa PS	1h	17%	
	3.75h	89%	>50%
	5h	-	No S.M.
Lipasa F1 Biocon.	6h	13%	
	O/N	88%	>75%

55

60

65

(Continuación)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Enzima	Tiempo	ee <sub>s</sub>	Conversión aproximada
Lipasa AK	2.75h	32%	
	5h	64%	
	O/N	64%	>50%
Quirazima -L9	1h	10%	
	5h	64%	>50%
	O/N	-	No S.M.
QuirozCLEC-PC	10 min	2%	
	1h	46%	>50%
Lipasa MY	6h	11%	
	O/N	33%	>75%
Lipasa DS	6h	2%	
	O/N	28%	
Estereasa cándida (Altus)	10min	27%	>50%
	1h	-	No S.M.
Proteasa B	O/N	26%	
Lipasa F-DS	6h	22%	
	O/N	-	No S.M.
Newlase F	6h	4%	
	O/N	20%	
Lipasa F	6h	20%	
	O/N	-	No S.M.
Alcalasa	1h	8%	
	5h	13%	
	O/N	18%	~50%
Lipasa R	6h	9%	
	O/N	17%	

**Tabla 2:** Enzimas que dejan selectivamente el pico 2 en el ensayo de ee de butirato

Enzima	Tiempo	ee <sub>s</sub>	Conversión aproximada
PPL	5h	92%	
	O/N	96%	>50%
Lipasa G	6h	3%%	
	O/N	41%	>50%
PLE, Grado tec	1h	35%	>50%
Quirazima -E1	30 min	13%	
	1h	21%	>50%
Quirazima -L2	1h	8%	
	1.75h	22%	>50%

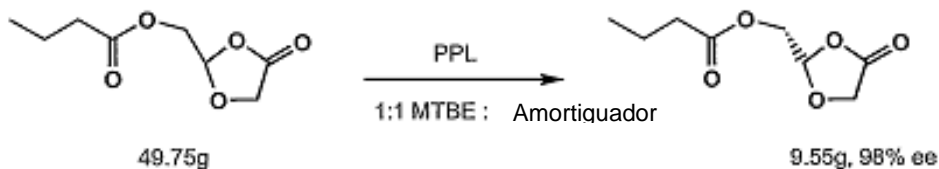
La  $\alpha$ -quimotripsina no dio ninguna reacción con el compuesto 1.

Las siguientes enzimas dieron reacciones no selectivas con el compuesto 1 (<10% ees): lipasa AY, lipasa A "Amano" 6, lipasa A "Amano" 12, lipasa N conc, lipasa AP6, Sigma CCL, lipasa de germen de trigo, Quirazima-L5, ChiroCLEC-CR, proteasa M, peptidasa R, proteasa ácida A, proteasa ácida II, proteasa ácida DS, proteasa A-DS, proteasa N, proteasa A2G, proteasa NL, proteasa DS, proteasa S, proteasa P "Amano" 6, levadura 6, Proleather, Bromelina-F, papaína W-40 (Amano), papaína (Sigma), proteasa X, proteasa XXXI, Savinasa, Esperasa, Pepsina, ChiroCLEC-BL, estereasa de ketoprofeno y Quirazima-E2.

#### Ejemplo 14

##### Incremento de escala de la resolución PPL del compuesto 1

Para determinar cuál fue el (R)-isómero, una cantidad de compuesto uno fue resuelto utilizando la enzima más prometedora del conjunto de exámenes mencionadas anteriormente, y se expuso a la secuencia sintética a un intermedio donde el orden de eluciones isoméricas por un ensayo quiral fue conocido. La enzima más prometedora de la examinación fue la PPL (lipasa pancreática porcina - porcine pancreatic lipase, Sigma), por lo tanto, esta reacción fue incrementada de escala hasta 50 g de aporte del sustrato racémico (esquema 10).



68% de conversión por absorción básica

**Esquema 10:** Resolución por medio de PPL a larga escala del Compuesto 1

La optimización mínima de las condiciones de reacción fue realizada, aparte de incrementar la concentración de sustrato 50 g/litro (una reacción con 5 g de sustrato fue ejecutada exitosamente como un ensayo). La reacción de 50 g fue iniciada con un 5% masa de PPL a 30 °C y se agregó 3 M de NaOH mientras procedía la reacción para intentar mantener al pH a 7. Sin embargo, la reacción fue extremadamente rápida y después de 25 minutos fue enfriada a 15 °C y el pH fue mantenido a 6.

En particular, a un recipiente revestido a 30 °C se le agregó MTBE (500 mL), 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7 (500 mL) y el Compuesto racémico 1 (49.75 g, 0.265 mol, TP-0257/98/D). A la mezcla agitada (pH 7) se le agregó PPL (2.5 g, 5 por ciento masa), luego 3M de NaOH fueron agregados para mantener al pH a 6. Debido a la velocidad de la

reacción, después de 25 minutos el recipiente fue enfriado a 15 °C y la reacción fue ejecutada a esta temperatura. El ees fue medido en intervalos de tiempo al remover las porciones de MTBE, diluyéndose con más MTBE, secándose (MgSO<sub>4</sub>), y analizándose por medio de GC quiral. Después de una hora 10 minutos el ees alcanzó el 98% y la reacción fue exaltada. La mezcla fue filtrada a través de diatomita y la diatomita fue lavada con MTBE (200 ml). A la mezcla se le permitió separarse y la capa orgánica fue retenida. La porción acuosa fue re-extraída entonces con MTBE (500 mL). Las estaciones de MTBE fueron combinadas, secadas (MgSO<sub>4</sub>) y evaporadas al vacío para dar 22 g de un aceite crudo amarillo. El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de columnas de destellos sílices (20% de EtOAc:80% de heptano) para dar 9.55 gramos de (S)- compuesto 1 en forma de un aceite amarillo muy pálido, 98% de ee, 95% puro por GC-MS. 1.5 g adicionales de material menos puro fueron obtenidos también. La producción combinada fue del 22%.

GC-MS (CPSi18 CB/MS, 30m x 0.25mm, 60°C durante 5 min, 10°C/min a 300°C) 13.98 min, M = 173 (M+ - CH<sub>3</sub>), 95% puro por área del pico.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.85 (t, 1H, CH-O), 4.35 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>O), 2.35 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.7 (sextet, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.95 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).

El ee<sub>s</sub> fue medido a intervalos de tiempo (pico 2 en el ensayo ee).

**Tabla 3:** Resolución PPL del compuesto 1

Tiempo	Conversión por absorción básica	pH real	ee <sub>s</sub>
5 min	28%	6.5	-
10 min	57%	6.5	53%
55 min	63%	6.0	89%
1h 10 min	68%	6.0	98%

La reacción fue exaltada después de una hora 10 minutos y el Compuesto 1 resuelto e aislado fue purificado por medio de cromatografía de columna de sílice. Esto produjo 9.55 gramos de un éster, con una pureza del 95%, con un 98% de ee, junto con 1.5 gramos de un éster menos puro (22% de reducción general). La impureza en el lote principal del éster (9.55 gramos) fue un ácido butírico. Este material fue tomado a través de la secuencia sintética a un intermediador donde la orden de elución isomérica por medio de un ensayo quiral fue conocida, y se determinó ser el (S)-compuesto 1. Para obtener el (R)- isómero, no se necesitó una enzima que deje selectivamente el pico 1 en el ensayo quiral del Compuesto 1.

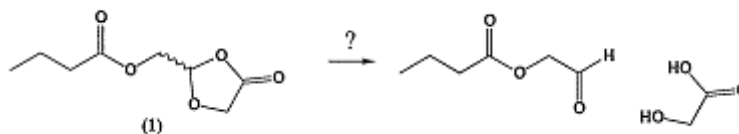
### Ejemplo 15

#### Optimización de las resoluciones enzimáticas comerciales que generan al (R)-compuesto 1

Tal como puede verse en la tabla 1, la examinación inicial mostró que la lipasa inmovilizada SAWA, la lipasa M, la lipasa PS y la lipasa F1 Biocon eran potencial candidatos para generar eficientemente al (R)-compuesto 1. Las resoluciones fueron subidas de escala para determinar su efectividad (la lipasa F1 Biocon ya no es comercialmente disponible).

La enzima fue agregada a 2-5 g de éster en 15-20 ml cada una de solvente y amortiguador (0.2 N de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). La solución de hidróxido de sodio fue agregada para controlar el pH. El procedimiento de exaltación fue filtrar (diatomita), extraer (MTBE), lavar con bicarbonato de sodio acuoso saturado, secar (MgSO<sub>4</sub>) y concentrar. El análisis fue hecho por medio de GC quiral (Chirasil Dex CB). Las variables estudiadas fueron la enzima, el solvente, el pH y la temperatura (refiérase a la tabla 4).

Ensayos iniciales con lipasa PS, lipasa M y lipasa de pseudomonas inmovilizada de SAWA en un amortiguador de fosfato de pH 7 generaron al sustrato remanente con excesos enantioméricos del 90%, pero la recuperación del (R)-compuesto 1 fue baja (menos que 5%). La estabilidad del butirato fue investigada con un pH 7 y un pH 6 bajo condiciones normales de la reacción, pero sin enzimas presentes (registros 20 y 21). A un pH 7 la base significativa fue consumida para mantener el pH y después de la exaltación y del aislamiento solamente el 50% de (1) fue recuperado después de 3.5 horas. La estabilidad es significativamente mejor con un pH 6. Posiblemente, la modalidad de la descomposición es la apertura de la lactona-acetal para generar un aldehído y un ácido glicólico (Esquema 11).



Esquema 11: Sendero posible descomposición del compuesto 1

Tabla 4: Optimización de la resolución del compuesto 1

Registro	Enzima	Co-solvente	pH	Temperatura/ grados centígrados	mmol Base:SM	S.M. ee/%	Generación S.M./%	E( <i>i</i> )	Comentarios
1	Lipasa PS	MTBE	6- 7	20	20:28	>95	0	-	S.M. insignificante, 2 horas
2	Lipasa PS	MTBE	7	20	33:27	>95	0	-	
3	Lipasa PS	MTBE	6	20	13:12	90	6.2	1.9	S.M. insignificante, 5 horas
4	Lipasa PS	MTBE	7	10	28:26	>95	0	-	S.M. insignificante, 4.5 horas
5	Lipasa PS	MTBE	5- 7	10	10:13	82	0	-	1M de amortiguador
6	Lipasa PS	Heptano	6- 7	0	8:17	88	NI	-	
7	Lipasa PS	Heptano	6	0	10:24	88	14	3.1	
8	Lipasa PS	Tolueno	6	0	10:19	54	45	4.3	
9	Lipasa PS	MEK	6	0	2:20	19	70	3.1	
10	Lipasa PS	THF	6	0	4:19	36	46	2.6	
11	Lipasa PS	DCM	6	0	4:19	12	68	1.9	
12	Lipasa PS	Dioxano	6	0	6:18	50	22	1.9	
13	SAWA	MTBE	6	20	8.6: 15	81	21	3.3	
14	SAWA	MTBE – EtOH	-	20	-	0	NI	-	No agua, racémico
15	SAWA	Tolueno	6	0	13:19	37	41	2.4	
16	Lipasa M	MTBE	6	20	20:15	-	0	-	No S.M. 20 horas
17	Lipasa M	MTBE	7	0-5	28:27	83	NI	-	1M de amortiguador
18	Lipasa M	Tolueno	6	0	14:19	39	42	: 5	
19	CLEC- PC	MTBE	6	20	-	-	0	-	No S.M. remanente
20	Ninguna	MTBE	7	20	9:9	-	48	-	35 horas, S.M. se descompone
21	Ninguna	MTBE	6	20	Ninguna base	-	NI	-	2 horas, ninguna base consumida

(i) Constante de enantioselectividad - refiérase al ejemplo 12

Otros 2 controles mostraron que el éster de inicio de un 98% de ee no es racemizado por las condiciones de la reacción a un pH 6 o pH 7. Una reacción de prueba adicional demostró que después de 24 horas a un pH 6, 100 g/mililitro de sustrato en 2:1 tolueno: 1 M de amortiguador y 0 °C, tuvo una producción superior al 90% del material inicio que fue recuperada sin ninguna pérdida de exceso enantiomérico. Por lo tanto, la racemización y la estabilidad

de sustrato bajo estas condiciones de reacción no presentan problemas.

5 Con estos resultados en mente, todas las reacciones enzimáticas adicionales fueron realizadas con un pH 6. Los mejores resultados del estudio se demuestran en los registros 7, 8, 9 y 13. La resolución enzimática más prometedora fue con la lipasa PS en tolueno/amortiguador de pH 6 y un valor E de 4.3. Esto daría una producción del 17% con un 95% de ee. La resolución con lipasa PS fue investigada más en los ejemplos aquí mencionados. Las variables estudiadas para la optimización fueron la concentración, la tasa del volumen solvente: amortiguador, la carga enzimática, los aditivos y la temperatura.

10 Las condiciones óptimas fueron determinadas como 0 °C, 100 g/litro de sustrato en 1:1 tolueno: amortiguador de fosfato de potasio (pH 6) que genera un 95% de ee, un 22% de producción del (R)-Compuesto 1. A 200 g/litro de concentración de sustrato, se obtuvo un 17% de producción con un 95% de ee del (R)-Compuesto 1.

### 15 **Ejemplo 16**

#### **Examinación enzimática microbiana**

20 De una examinación de alrededor de 200 cepas (utilizando el nuevo método de placas de 96 pozos), se identificaron 7 positivas que dejaron al (R)-isómero del Compuesto 1 (pico 1). Estos fueron clasificados como positivos si es que ellos hidrolizaban al éster y daban >10% de ee del sustrato remanente, teniendo el potencial, por lo tanto, de generar un éster con un ee más alto.

25 La examinación fue realizada en 0.1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0 con 20 g/litro de éster a 25 °C durante aproximadamente 16 horas. Los resultados son mostrados en las **figuras 5A y 5B**.

30 Las 7 cepas positivas (pico 1) de la examinación primaria fueron cultivadas en matraces con TSB (caldo de trisona de soya - tryptone soya broth) y las pastas celulares fueron cosechadas. Estas fueron re-suspendidas al 10% masa/volumen en 0.1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0 + 20 g/L de éster y agitadas en recipientes de destello (a 1.0 mililitros por recipiente) hasta durante 92 horas a 25 °C. Los resultados son mostrados en la tabla 5.

35

40

45

50

55

60

65

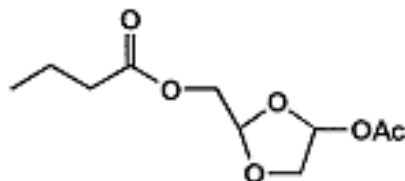


Tabla 5: Investigación adicional de cepas microbiana positivas

N°.	N°CMC	Nombre	Tiempo/h	Pico 1	Pico 2	ee <sub>s</sub>
1	3127	<i>Serratia liquifaciens</i>	17.75	13291	10863	10.1%
			24	71866	67553	3.1%
			47			
			92			
2	3322	<i>P.alcaligenes</i>	17.75			
			24			
			47			
3	3373	<i>Acinetobacter sp</i>	17.75	67157	64051	2.4%
			24	9827	8169	9.2%
			47			
			92			
4	3418	Indefinido	17.75	14606	9430	21.5%
			24	11627	8948	13.0%
			47			
			92			
5	3419	<i>Acinetobacter</i>	17.75	69727	30271	39.5%
			24	55222	22993	41.2%
			47	18804	2077	80.1%
			92			
6	3606	<i>Acinetobacter junii</i>	17.75	114861	14557	77.5%
			24	93782	23728	59.6%
			47	45250	6326	75.5%
			92	7789	880	79.7%
7	3635	Indefinido	17.75	26812	23798	6.0%
			24	6685	4022	24.9%
			47	2134	1139	30.4%
			92			
8	Vacio	Sin Enzima	17.75	254977	256011	0.2%
			24	215295	216508	0.3%
			47	86300	85001	0.8%
			92	20053	19960	0.2%

Los resultados del control muestran que el éster no es estable más allá de 24 horas a 25 °C. Existe una reducción del 97% en el tamaño del área pico entre las áreas y como a las 17 y a las 92 horas. Esto explica claramente por qué todas las áreas pico de muestra indican una caída dramática. De las cepas que fueron re-examinadas, CMC 3606 (*Acinetobacter junii*) y CMC 3419 (*Acinetobacter*) mostraron una buena enantioselectividad (80% de ee para el pico 1). Estas 2 cepas fueron re-cultivadas [CMC 3606 en matraces (tal como si fuese una bacteria no identificada) y CMC 3419 en matraces de fermentación] y se prepararon para más evaluaciones. Para CMC 3322 (*P. alcaligenes*) no existió ningún éster detectable después de 17 horas. Esto puede ser debido a un cambio en el pH (con las células lizándose) o de una alta actividad de estereasas.

### Ejemplo 17



Compuesto 3

### Desarrollo analítico para el Compuesto 3

Un ensayo GC quiral fue desarrollado para separar los 4 posibles diaestereómeros del Compuesto 3. Los detalles de las condiciones del ensayo se establecen a continuación.

#### Condiciones GC:

<b>Columna:</b>	Chiraldex GTA
<b>Dimensiones:</b>	30m x 0.25mm
<b>Programación de la temperatura:</b>	100 °C durante 20 minutos luego a 160 °C a 2 °C/minuto
<b>Gas portador:</b>	Helio @ 14 psi
<b>Detección:</b>	FID @ 200°C
<b>Tiempos de retención:</b>	1 - 41.74 min    2 - 41.96 min 3 - 43.07 min    4 - 43.82 min

Un GC-MS quiral del éster de inicio dio 2 picos a los 15.98 y 16.27 minutos (diaestereómeros) en una tasa de 1:1.4 respectivamente. Refiérase a la **figura 1B**. La comparación de los 4 picos del ensayo ee/de GC quiral y los picos GC-MS indicaron que los picos 1 y 2 fueron enantiómeros y los picos 3 y 4 fueron enantiómeros en el ensayo ee/de.

### Examinación Enzimática, Compuesto 3

**Lipasas:** A cada matraz de destello se agregó 50 µl del Compuesto 3 (TP-0259/98/A), MTBE (5 ml) y 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7 (5 mL), seguido por 20 mg de la enzima. Los matraces fueron agitados en una incubadora configurada a 30 °C con las porciones removidas periódicamente y expuestas a ensayos por medio de TLC (50% EtOAc/heptano) y GC quiral.

**Proteasas y Estereasas:** Tal como se mencionó anteriormente, excepto que el solvente de la reacción fue 5 ml, 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7 u 8 sin MTBE. Las reacciones de proteasas ácidas fueron realizadas con un pH 3 utilizando 0.1 M de la solución de ácido láctico [pepsina, proteasa ácida A (Newlasa A), y la proteasa ácida II (Newlasa II)].

Para algunas enzimas que fueron conocidas por ser muy activas para estos sustratos, las reacciones fueron realizadas con un monto apropiado de enzimas para dar una tasa razonable de reacción, usualmente 10-15% masa. Las enzimas que requirieron estas cargas reducidas fueron la Quirazima-L2, -E1 y -E2, todas las CLECs, la estereasa de colina y la estereasa cándida (Altus).

El Compuesto racémico 3 fue examinado para detectar hidrólisis enzimática con lipasas, proteasas y estereasas disponibles comercialmente. Todas las reacciones de lipasas fueron ejecutadas en la presencia de 50 µl de compuesto 3.5 ml de MTBE, 5 ml de amortiguador de fosfato de pH 7. 50 por ciento masa de las enzimas (excepto la Quirazima-E1, la Quirazima-E2, la Quirazima-L2, la estereasa cándida, la estereasa de colina y las CLECs, 10% masa). Las reacciones de las estereasas y las proteasas fueron realizadas sin la presencia de MTBE. Las reacciones fueron seguidas por un TLC y un GC quiral.

La estereoquímica en el centro del acetato no es importante puesto que se establece después en la síntesis del DAPD activo aglutinado. Por lo tanto, es deseable el resolver en relación al centro del butirato. Sin embargo,

inicialmente fue conocido cual pico correspondía a cual isómero. Las reacciones de control, que no contenían enzimas, mostraron que el sustrato fue estable bajo las condiciones de reacción. Los resultados de la examinación para la resolución del Compuesto 3 se muestran en las **Tablas 6-11**.

5 **Tabla 6:** Examinación enzimática del Compuesto 3 - enzimas que son selectivas para los picos 1/3

Enzima	Tiempo	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	ee	Picos	Conversión por medio de TLC
Peptidasa R	3.5h	32.0	27.5	40.0	0.5	8% 98%	1 3	~20%
	O/N	68.5	0.0	31.5	0.0	99% 99%	1 3	~50%
Proteasa M	1.25h	31.0	20.0	37.0	12.0	22% 51%	1 3	<20%
	6.5h	58.5	2.0	39.5	0.0	93% 99%	1 3	~50%
Proteasa ácida A (Newlasa A)	4h	36.5	3	60.5	0	85% 99%	1 3	~50%
Proteasa B	7h	17.5	12.5	62.5	7.5	17% 79%	1 3	~50%
	24h	31	0	69	0	99% 99%	1 3	>80%
Quirazima L2	45 min	28.0	21.0	35.5	16.0	14% 38%	1 3	~30%
	1.75	39.0	15.5	41.0	4.5	43% 80%	1 3	~50%
Proteasa A	3.5h	40.5	20.5	28.5	10.5	33% 46%	1 3	40-50%
	6.5h	51.5	18.0	26.5	4.0	48% 74%	1 3	~60%
Proteasa A 2G	3.5h	40.0	23.5	22.5	16.5	26% 15%	1 3	~50%
	O/N	70.5	5.0	15.0	10.0	87% 20%	1 3	>75%
Estereasa de Ketoprofeno	3.5h	8.5	1.5	56.0	40.0	70% 17%	1 3	~60%
	6.5h	9.0	2.0	56.0	40.0	64% 17%	1 3	~60%
Proteasa N	1.25h	22.5	18.0	31.0	28.5	11% 4%	1 3	10-20%.
	6.5h	24.0	17.5	33.0	25.5	16% 13%	1 3	10-20%
PPL	3.5h	34.0	25.5	20.0	20.0	14% Rac	1 3/4	10-20%
	6.5h	43.5	26.0	16.0	14.0	25% 7%	1 3	~60%

65 Estos resultados muestran que la peptidasa R, la proteasa M y la proteasa ácida A (Newlasa A) tienen una excelente selectividad para los picos 1 y 3; mientras que la proteasa B, la Quirazima-L2 y la proteasa A tienen una selectividad

razonable para los picos 1 y 3.

**Tabla 7:** Examinación enzimática del Compuesto 3 - Enzimas que son selectivas para los picos 1/4

Enzima	Tiempo	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	ee	Picos	Conversión por medio de TLC
PLE	1.25h	35.0	19.0	11.5	35.0	30%	1	~50%
	6.5h	70.0	10.0	0.0	20.0	50%	4	>80%
Quirazima -E1	15min	33.0	19.0	17.0	31.0	27%	1	~50%
	45min	52.0	12.0	8.0	28.0	29%	4	>80%
Quirazima -E2	1.25h	46.5	20.0	11.0	22.0	40%	1	~60%
	3.5h	54.5	19.5	8.5	17.5	33%	4	>80%
PLAP	24h	32.5	24.5	9.5	33.5	14%	1	>50%
						56%	4	

Por lo tanto la PLE y la Quirazima-E1 son razonablemente selectivas para los picos 1 y 4

**Tabla 8:** Examinación enzimática del Compuesto 3 - Enzimas selectivas para el pico 1

Enzima	Tiempo	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	ee	Picos	Conversión por medio de TLC
Papaína (Sigma)	7h	64.5	19	16.5	0	54%	1	~50%
	24h	93.5	5	1.5	0	100%	3	>50%
Proteasa P Amano 8	1h	44	23.5	14	18.5	30%	1	~50%
	4h	84.5	15.5	0	0	14%	4	>80%
Polizima 8	1h	44	26	12	18	26%	1	~50%
	4h	78	22	0	0	20%	4	>80%
						56%	1	

Estos resultados muestran que la papaína tiene una muy buena selectividad para el pico 1.

**Tabla 9:** Examinación enzimática del compuesto 3 - Enzimas que son selectivas para los picos 2/3

Enzima	Tiempo	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	ee	Picos	Conversión por medio de TLC
Lipasa AK	3.5h	22.0	52.5	24.0	2.0	41% 85%	2 3	~20%
	6.5h	14.0	73.5	12.5	0.0	68% 99%	2 3	~60%
Lipasa MY	1.25h	19.0	31.5	36.0	13.5	25% 45%	2 3	30-40%
	6.5h	8.5	76.0	15.5	0.0	80% 99%	2 3	>80%
Lipasa AY	3.5h	20.5	39.5	32.5	7.5	32% 63%	2 3	10-20%
	6.5h	17.5	56.0	25.0	1.5	52% 89%	2 3	~50%
CCL	3.5h	20.5	27.5	32.5	19.0	15% 26%	2 3	10-20%
	6.5h	20.5	33.5	33.0	13.0	24% 43%	2 3	30-40%
Proteasa ácida A	6.5h	21.5	24.0	29.0	25.5	5% 6%	2 3	~30%
	O/N	22.5	36.0	25.0	16.0	23% 22%	2 3	~50%
Proteasa NL	7h	22	24	33	21	Rac 22%	2/1 3	<50%
	24h	23.5	29.5	35.5	11.5	11% 51%	2 3	~50%

Estos resultados muestran que la lipasa AK, la lipasa MY y la lipasa AY son razonablemente selectivas para los picos 2 y 3.

**Tabla 10:** Examinación enzimática del Compuesto 3 - Enzimas que son selectivas para los picos 2/4

Enzima	Tiempo	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	ee	Picos	Conversión por medio de TLC
Proteasa XXI	4h	25.5	29.5	19	26	7% 16%	2 4	~50%
	24h	31	46	7.5	15.5	19% 34%	2 4	>50%
Proleather	4h	25.5	30.5	18.5	25.5	9% 16%	2 4	~50%

Por lo tanto ninguna enzima que es electiva para los picos 2 y 4 da un exceso enantiomérico particularmente alto.

**Tabla 11:** examinación enzimática del compuesto 3 - enzimas selectivas del pico 2

Enzima	Tiempo	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	ee	Picos	Conversión por medio TLC
Lipasa PS	3.5h	18.5	65.5	3.5	12.5	56%	2	~40%
	6.5h	7.5	89.0	0.0	3.5	56%	4	>80%
Quirazima L5	1h	25	33	27	15	14%	2	~50%
	4h	20	80	0	0	29%	3	>80%
Quirazima L9	3.5h	34.0	40.0	5.5	21.0	8%	2	~50%
	6.5h	38.0	57.0	0.0	5.5	58%	4	>80%

Estos resultados muestran que la lipasa PS es razonablemente selectiva para el pico 2.

No se observó ninguna reacción con la  $\alpha$ -Quimotripsina, la lipasa GC, la lipasa PGE, la lipasa N conc, la lipasa G, la lipasa R, la lipasa M, la lipasa A "Amano" 12, la lipasa AU miles 1988, la lipasa F1 Biocon., la lipasa de germen de trigo, la papaína W-40, la proteasa S, la proteasa X y la pepsina.

Las enzimas que dieron una hidrólisis no selectiva fueron la proteasa ácida II (Newlase II), la bromelina F, la alcalasa, la Savinasa, la esperasa, el QuiroCLEC-BL, la lipasa de pseudomonas inmovilizadas de SAWA, la lipasa F. La esterasa cándida de Altus dio una reacción que fue demasiado rápida para recaudar cualquier información de exceso enantiomérico.

Después de que se completó esta examinación, una muestra del Compuesto 3 resuelto fue preparada por medio de la reducción de (S)-Compuesto 1 proveniente de una resolución de PPL. Esto fue ejecutado en el ensayo ee/de dando los picos 1 y 4. Puesto que la resolución de PPL da al (S)-Compuesto 1, los picos 2 y 3 fueron necesitados para la resolución del Compuesto 3. Los resultados de la detección mostraron que la mayoría de enzimas resolvieron al compuesto 3 en el centro acetato, no en el centro butirato requerido. Sin embargo, la lipasa AK, la lipasa MY, la lipasa AY y la lipasa PS dieron los picos requeridos con una selectividad razonable.

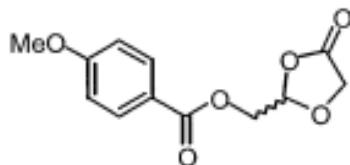
Las resoluciones del Compuesto 3 con la lipasa PS y la lipasa MY fueron investigadas más (la lipasa AK ha sido descontinuada por Amano). El incremento de escala y el aislamiento del producto fue necesario para determinar si las resoluciones fueron eficientes (refiérase a la **Tabla 2**). La lipasa PS en tolueno dio una producción del 39% del material inicial recuperado con un ee efectivo del 58% y un E efectivo de 3.7 (esto da una medida del monto de (R)-butirato correcto que está presente en la mezcla). Estas selectividades no fueron mejores que las que se obtuvieron para el Compuesto 1 con la lipasa PS, E=5.3. Además, puesto que, en una sección, el paso de resolución es más temprano en la secuencia de reacción, los siguientes ejemplos se concentran en optimizar la resolución del Compuesto 1.

**Tabla 12:** Investigaciones adicionales de las resoluciones del compuesto 3

Escala / gramos	Solvente conc. Gramos/litros	Enzima % masa	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Producción S.M.	ee efectivo S.M.	E efectivo
1.4	50 MTBE	PS, 3	23	45	13	19	52%	16%	1.6
1.3	50 tolueno	PS, 6	15	65	14	6	39%	58%	3.7
1.3	50 MTBE	MY, 5	23	45	13	19	52%	16%	1.6
1.2	50 tolueno	MY, 4	22	28	35	15	42%	26%	1.8

Condiciones: 20 °C, 1:1 solvente: amortiguador pH 7

### Ejemplo 18



Compuesto 11

**Desarrollo Analítico del Compuesto 11**

Un ensayo quiral fue requerido para el Compuesto 11. Una separación de la línea base fue alcanzada por medio de un HPLC quiral utilizando la columna Chiralpak AS. Refiérase a la figura 1C.

**Condiciones HPLC:**

**Columna:** Chiralpak AS  
**Dimensiones:** 250mm x 4.6mm  
**Fase móvil:** 1:1 IPA:EtOH  
**Caudal:** 0.6 ml/min  
**Detección:** UV 254nm  
**Temperatura:** ambiente

**Tiempos de retención: Pico 1 -11.96 minutos pico 2 -13.17 minutos**

Puesto que este compuesto estuvo experimentando una examinación microbiana (>400 muestras) así como una examinación enzimática comercial un tiempo de ejecución menor de 5 minutos fue requerido. El ensayo previo fue tomado para SFC cuando esto fue logrado. Refiérase a la figura 1D.

**Condiciones SFC:**

**Columna:** Chiralpak AS  
**Dimensiones:** 250mm x 4.6mm  
**Fase móvil:** 95% CO<sub>2</sub>:EtOH  
**Caudal:** 3.0 ml/min, 3000 psi  
**Detección:** UV 254nm  
**Temperatura:** 35 °C

**Tiempos de retención: Pico 1 - 2.88 minutos Pico 2 - 3.95 minutos****Examinación enzimática para el compuesto 11**

**Lipasas:** En un matraz de destello de 40 µl el Compuesto 11 MTBE (5 mL), 50 mM de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 (5 mL), y aproximadamente 10 mg de enzimas fueron agitados en una incubadora a 30 °C. Las porciones fueron removidas periódicamente y expuestas a ensayos por medio de TLC (50% de EtOAc/heptano) y HPLC quiral.

**Proteasas y estereasas:** Tal como se mencionó anteriormente, pero sin el MTBE.

2 conjuntos de condiciones fueron utilizados para la examinación del compuesto 11, el éster racémico de metoxibenzoato, dependiendo de si la enzima utilizada fue una lipasa o una proteasa/estereasa. Para hidrólisis catalizadas de lipasas, el solvente de la reacción fue 1:1 de éter de terc-butilo de metilo (MTBE - methyl *tert*-butyl ether): 50 mM de amortiguador de fosfato de potasio a un pH 6. Para la proteasa y para las hidrólisis catalizadas de estereasa, las reacciones fueron ejecutadas en el amortiguador de fosfato sin un co-solvente orgánico inmiscible. Las reacciones fueron ejecutadas en matraces de destello en un agitador a 30 °C y después de eso se hizo una cromatografía de capa delgada (TLC - thin layer chromatography). El exceso enantiomérico del sustrato residual (los valores ees) fue determinado por un análisis de HPLC (Chiralpak AS). El producto alcohólico de la hidrólisis de estos ésteres fue conocido por ser inestable a partir del ejemplo descrito anteriormente. Por lo tanto, sin un ensayo quiral para el posible producto, las conversiones no podrían ser calculadas, por lo que se tomó en cuenta si es que algún sustrato estaba todavía presente por medio de un análisis de TLC.

Los resultados de las examinaciones se muestran en las tablas a continuación. La **Tabla 3** muestra los resultados para las enzimas que dejan selectivamente al enantiómero que corresponde al pico 1 en el ensayo quiral de HPLC, y ¡error! La fuente referencial no se encuentra. Los resultados para la selectividad enzimática para el pico 2.

**Tabla 13:** Enzimas que dejan selectivamente al pico 1 en el ensayo de HPLC

	<b>Enzima</b>	<b>Tiempo</b>	<b>ees/%</b>	<b>Comentarios</b>
5	Lipasa M	72 horas	24	pico 1
		2 semanas	29	sustrato presente
	Lipasa PS	72 horas	7	pico 2
		2 semanas	22	sustrato presente
10	Quirazima-L9	72 horas	19	pico 1
		2 semanas	56	sustrato presente
	Lipasa MY	72 horas	7	pico 1
		2 semanas	21	sustrato presente
	Lipasa DS	72 horas	25	pico 1
		2 semanas	66	sustrato presente
15	Lipasa F-DS	72 horas	52	pico 1
		2 semanas	80	sustrato presente
	Lipasa F	72 horas	37	Pico 1
		2 semanas	68	sustrato presente
20	Quirazima-L2	18 horas	100	Pico 1
		2 semanas	100	sustrato presente
	Lipasa AY	72 horas	31	Pico 1
		2 semanas	69	sustrato presente
	Lipasa A "Amano" 12	72 horas	16	pico 1
		2 semanas	45	sustrato presente
25	Lipasa cono N	72 horas	33	pico 1
		2 semanas	46	sustrato presente
	Lipasa AP6	72 horas	17	pico 1
		2 semanas	43	sustrato presente
	Sigma CCL	72 horas	20	pico 1
		2 semanas	62	sustrato presente
30	Proteasa ácida A	48 horas	24	pico 1
		2 semanas	76	sustrato presente
	Proteasa ácida DS	48 horas	66	pico 1
		2 semanas	92	sustrato presente

**Tabla 14:** Enzima que dejan selectivamente el pico 2 en el ensayo HPLC

	<b>Enzima</b>	<b>Tiempo</b>	<b>ees/%</b>	<b>Comentarios</b>
40	Lipasa PS	72 horas	7	pico 2
		2 semanas	22	sustrato presente

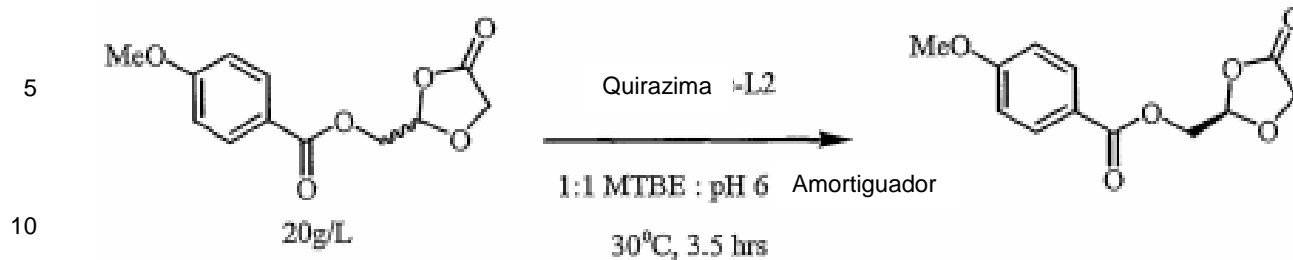
Las siguientes enzimas no fueron selectivas (>20% de ees en cualquier pico): lipasa inmovilizada de SAWA; Chirolec-PC; proteasa B; Newlasa F; Alcalasa; lipasa R; PPL; lipasa G; PLE; Quirazima-E1; Quirazima-L5; QuiroCLEC-CR; proteasa M; peptidasa R; proteasa ácida A-DS; proteasa N; proteasa A2G; proteasa NL; proteasa DS; proteasa S; proteasa P "Amano" 6; Prozima 6; Proleather; bromelina-F; papaína W-40 (Amano); papaína (Sigma); proteasa X; proteasa XXXI; Savinasa; Esperasa; Pepsina; QuiroCLEC-BL; esterasa de colina; Quirazima-E2; y  $\alpha$ -Quimotri.

### Ejemplo 19

#### Incremento de escala de la resolución de Quirazima-L2 del Compuesto 11

Durante los estudios iniciales de la resolución del Compuesto 11, no era conocido como los enantiómeros se correlacionaban a los picos en el ensayo quiral de HPLC. Para determinar la configuración absoluta, una muestra fue tomada a través de toda la secuencia sintética a un intermedio de DAPD donde la configuración podría determinarse. Una de las enzimas más prometedoras de la examinación fue la Quirazima-L2; por lo tanto, esta reacción fue incrementada de escala para preparar una muestra (Esquema 12). La concentración de sustrato fue incrementada a 20 g/litros y la carga enzimática fue reducida, pero de otra forma la optimización del proceso fue mínima. Con 1 g de aporte de racemato, 5% masa de Quirazima-L2 a 30 °C con él pH manteniéndose entre 5 y 6, se obtuvieron 0.321 gramos (32%) de éster con un ee >98% y con buena pureza.





**Esquema 12:** Incremento de escala de la resolución del compuesto

15 A la reacción se le subió de escala aún más a 10 g; después de 3.5 horas, 3.9 gramos del Compuesto 11 fueron obtenidos con una producción del 39%, un ee >99% en forma de un sólido blanco. Se determinó que este era el (S)-enantiómero no deseado. Consecuentemente el (R)-enantiómero deseado debe corresponder al pico 2 en el ensayo quiral de HPLC.

20 Por lo tanto, un recipiente cubierto de 500 ml a 30 °C fue cargado con MTBE (250 mL), el Compuesto racémico 11 (10.00 g, 39.7 mmol, TP-43/100) y 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 (250 mL). La Quirazima-L2 (500 mg, 5% masa) fueron agregados a la mezcla agitándose. El pH fue mantenido entre 5 y 6 mediante la adición de 2N de NaOH. Después de 3.5 horas, la absorción básica se detuvo, y la mezcla se filtró a través de Celite® y se separó. La porción acuosa fue extraída con MTBE (2 x 200 mL), las capas orgánicas fueron combinadas, lavadas con 2N de NaOH (200 mL), sulfito de sodio (200 ml), 2N de HCl (200 mL) y se secadas (MgSO<sub>4</sub>). La concentración al vacío dio al Compuesto 11 en forma de un sólido blanco. Producción de 3.89 gramos, 39%; ee >99%; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) en forma consistente con la estructura.

### 30 Ejemplo 20

#### Incremento de escala de la resolución con la lipasa PS del Compuesto 11

35 A partir de la examinación inicial, sólo la lipasa PS fue un candidato que dio el (R)-enantiómero deseado del Compuesto 11 (¡refiérase al error! La fuente de la referencia no ha sido encontrada). Esta resolución fue incrementada de escala a 2 g para determinar su selectividad. A aproximadamente el 50% de conversión el exceso enantiomérico del éster residual fue solamente el 8%. La enzima claramente no es suficientemente selectiva para un proceso viable.

40 Un matraz revestido de 100 ml a 30 °C fue cargado con MTBE (25 mL), el Compuesto racémico 11 (2.00 g, 7.94 mmol, TP-43/100) y 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 (25 mL). Se agregó lipasa-PS (100 mg, 5% masa) a la mezcla agitándose. El pH fue mantenido entre 5 y 6 por medio de la adición de 2N de NaOH. Aproximadamente el 50% de conversión (por absorción básica), una porción fue tomada y analizada registrando un ee de un 8%. Después de 24 horas más no se detectó el sustrato.

### Ejemplo 21

#### Detección enzimática microbiana

#### 50 Procedimiento general para preparar placas de cultivos de 96 pozos

Placas de 96 pozos profundos de 2.2 mililitros fueron utilizados. 1.0 mililitros de TSB (caldo de soya de triptona - Tryptone soya broth, Oxoid CM129) estéril para bacterias, o YM (caldo de moho de levadura - Yeast mould broth, Oxoid CM920B) para levadura, fue agregado por cada matraz e inoculado con una porción de cultivo. Las placas fueron agitadas a 25 °C durante 48 horas o más. Los peletes celulares fueron cultivados por medio de centrifugación (miligramos durante 10 minutos a 4 °C) y el sobrenadante fue removido. Los peletes celulares fueron almacenados a -20 °C hasta que fueron requeridos para la examinación.

#### 60 Examinación de las placas de cultivo de 96 pozos profundos en relación al Compuesto 11

Una solución de 200 g/litro del compuesto 11 fue preparada en acetona. Se agregaron 450 µl de 0.1M de Tris-HCl + 0.1% Tween 80, pH 7.0 y 50 µl de la solución del Compuesto 1 por pozo en la placa de cultivo de 96 pozos profundos. Estas placas fueron agitadas a 25 °C durante 72 horas o más. Las muestras fueron extraídas a MTBE y se expusieron a ensayos por medio de HPLC quiral.

65

La examinación fue ejecutada con un rango de bacterias y levaduras. Estas fueron cultivadas en placas de 96 pozos profundos y sus peletes celulares fueron cosechados por medio de centrifugación. Esto permite que los peletes sean re-suspendidos en un amortiguador con un sustrato para su examinación. Las placas fueron agitadas a 25 °C durante 72 horas o más. Las muestras fueron extraídas en MTBE y se expusieron a ensayos de HPLC quiral. Los resultados de la examinación son resumidos en la **figura 3C**. Algunas coincidencias fueron identificadas como selectivas para dejar el enantiómero correspondiente al pico 1 en el ensayo, sin embargo, únicamente unas pocas cepas dieron el enantiómero deseado (pico 2) a un ee bajo. Esto podría deberse a los bajos niveles de la enzima expresada en los microorganismos de tipo silvestre, y por lo tanto habría una baja conversión. También debe tomarse en cuenta que el método de HPLC de alto caudal utilizado sólo puede dar valores aproximados. Los mejores resultados son mostrados en la **Tabla 15**.

**Tabla 15:** Examinación microbiana del compuesto 11

CMC No	Cepa	ee/% del sustrato	Selectividad*
103522	No identificada	23	Pico 2
103978	<i>Lactobacillus plantarum</i>	12	Pico 2
103947	<i>Comamonas acidovorans</i>	11	Pico 2
103826	<i>Bacillus licheniformis</i>	10	Pico 2
103397	<i>Pseudomonas sp.</i>	10	Pico 2
103308	<i>Phaffia rhodozyma</i>	63	Pico 1
103115	<i>Rhodococcus sp.</i>	61	Pico 1
103188	<i>Pseudomonas putida</i>	58	Pico 1
103126	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	44	Pico 1

\*Pico importante del éster residual en cromatogramas de HPLC.

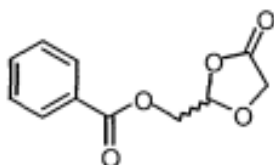
Las 5 cepas que dieron al pico 2 selectivamente y 3 que dieron al pico 1 fueron seleccionadas para más ensayos para confirmar los resultados de la examinación inicial; los resultados se muestran en la tabla 16. Solamente CMC 103522, el mejor candidato para el pico 2 de la primera examinación, confirmó su selectividad a un ee ≤10% del pico 2.

**Tabla 16:** Re-examinación de las cepas para el Compuesto 1

CMC No	Cepa	ee/% del sustrato	Selectividad*
103115	<i>Rhodococcus sp.</i>	5	Pico 1
103126	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	2	Pico 1
103188	<i>P. putida</i>	5	Pico 1
103397	<i>Pseudomonas sp.</i>	1	Pico 1
103522	No identificada	9	Pico 2
103826	<i>B. licheniformis</i>	4	Pico 1
103947	<i>C. acidovorans</i>	2	Pico 1
103978	<i>L. plantarum</i>	2	Pico 1

\*Pico importante del éster residual en cromatogramas de HPLC.

## Ejemplo 22



Compuesto 12

## Desarrollo analítico para el compuesto 12

Un ensayo quiral también fue requerido para el Compuesto 12. Refiérase a la **figura 1E**. Los detalles de las condiciones del ensayo son las siguientes:

## Condiciones HPLC:

**Columna:** Chiralpak AS  
**Dimensiones:** 250mm x 4.6mm  
**Fase móvil:** 1:1 IPA:EtOH  
**Caudal:** 0.8 ml/min  
**Detección:** UV 254nm  
**Temperatura:** ambiente

**Tiempos de retención: pico 1 - 6.91 minutos pico 2 - 7.66 minutos**

Otra vez este ensayo fue tomado para SFC para lograr un sub-tiempo de ejecución de 5 minutos para permitir al número grande de muestras de examinación microbiana ser analizadas en el tiempo más corto posible. Refiérase a la **figura 1F**.

## Condiciones SFC:

**Columna:** Chiralpak AS  
**Dimensiones:** 250mm x 4.6mm  
**Fase móvil:** 95% CO<sub>2</sub>:EtOH  
**Caudal:** 3.0 ml/min, 3000 psi  
**Detección:** UV 254nm  
**Temperatura:** 35 °C

**Tiempos de retención: pico 1 - 3.06 minutos pico 2 - 3.81 minutos**

## Examinación enzimática

El Compuesto 12 fue examinado en placas de cultivos de 96 pozos. La examinación del Compuesto 12 se basó en aquella desarrollada para el Compuesto 11, pero limitada a sólo 10 enzimas. 2 conjuntos de condiciones fueron utilizados, dependiendo de si la enzima era una lipasa o una proteasa/estereasa. Para las hidrólisis de lipasas catalizadas, la reacción solvente fue 1:1 de MTBE:50 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH 6. Para las proteasas y las hidrólisis de estereasas catalizadas, las reacciones fueron ejecutadas en el amortiguador de fosfato sin co-solventes orgánicos inmiscibles. En todas las reacciones el monto del sustrato utilizado fue de 40 mg. Las reacciones fueron ejecutadas en un baño de agitación a 30 °C y los valores de exceso enantiomérico fueron determinados por análisis de HPLC (Chiralpak AS). Los 3 resultados positivos son resumidos en la **Tabla 17**.

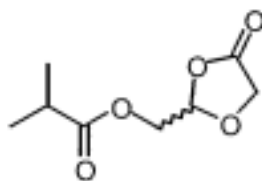
Tabla 17: Examinación enzimática comercial del compuesto 2

Enzima	Tiempo	ees/%	Comentarios
Quirazima-L2	20 horas	<b>95</b>	pico 2
	una semana	<b>100</b>	sustrato presente
Proteasa ácida DS	20 horas	<b>47</b>	pico 2
	una semana	-	sin sustrato
Quirazima-L9	20 horas	<b>8</b>	Pico 2
	una semana	<b>25</b>	sustrato presente

Las siguientes enzimas dieron resoluciones menos selectivas con el Compuesto 2 (<20% de ees): lipasa F-DS; lipasa PS; lipasa DS; lipasa AY; lipasa F; proteasa ácida A; y lipasa cono N.

Las muestras fueron expuestas a ensayos por medio de HPLC quiral; los resultados son resumidos en la figura 3D. Tal como se puede observar en la figura 3D, cepas microbianas fueron identificadas que son selectivas para ambos enantiómeros. Las conversiones, y por lo tanto sus selectividades verdaderas son desconocidas. Aunque la Quirazima-L2 fue identificada como una enzima excelente para dejar el enantiómero correspondiente al pico 2 en el ensayo HPLC, ninguna enzima fue identificada en esta examinación limitada que dejara el pico 1. No se conoce que pico en el ensayo quiral para el compuesto 2 corresponde al (R)-enantiómero requerido.

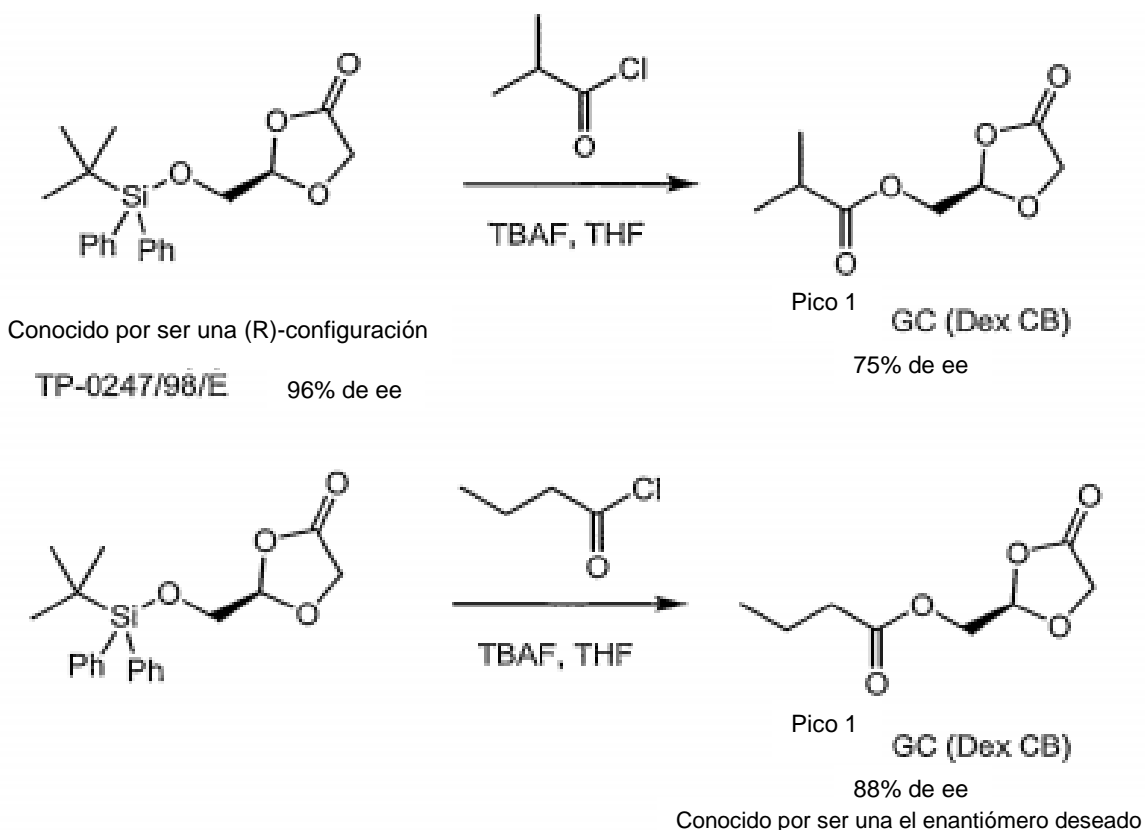
**Ejemplo 23**



**Compuesto 13**

**Determinación química de la configuración**

Cómo una forma rápida para determinar cuáles de los picos en el cromatograma GC corresponden al enantiómero deseado, se envisionsó que las muestras auténticas podrían ser hechas a partir de éter de sililo. El éter de sililo enantioméricamente enriquecido fue calentado con cloruro de 2-metilpropanoilo en tetrahidrofurano (THF) con fluoruro de tetrabutylamonio (TBAF - tetrabutylammonium fluoride) (refiérase al esquema 13).



**Esquema 13:** Determinación de la configuración para el Compuesto 13

El objetivo fue el dividir el éter de sililo y atrapar el alcohol generado in situ con cloruro ácido. Aunque el alcohol intermedio es inestable, si solamente una fracción pequeña reacciona con el cloruro ácido más rápido que la tasa de

descomposición, entonces el éster de la configuración conocida se generaría. Puesto que el ensayo quiral es un método GC, la sensibilidad es alta y cantidades pequeñas pueden ser detectadas. Empezando desde el éter de (R)-sililo, se observaron picos en los cromatogramas de GC para el producto, mejorados en el pico 1 en ambos casos. Estimulando a las muestras con racemato se confirmó que los picos correspondían a los ésteres deseados. Pérdidas ligeras del exceso enantiomérico fueron observadas en ambos casos, posiblemente debido a la acidez del medio y la inestabilidad potencial del alcor padre que es asumido como un intermedio. La configuración absoluta del éter de sililo inicial es conocida por ser la (R)-configuración deseada. El enantiómero que da el pico 1 en el ensayo GC para el éster de n-butanoato también es conocido por ser el enantiómero requerido. Por lo tanto, la reacción del éter de (R)-sililo con cloruro de 2-metilpropanoilo dará el enantiómero requerido del compuesto 13, y que esto corresponde al pico 1 en el ensayo GC. Puesto que el otro enantiómero del éter de sililo estuvo disponible, para una confirmación extra también se demostró que daba el enantiómero del pico 2 en la reacción con el cloruro de 2-metilpropanoilo.

#### Procedimiento experimental para la preparación de ésteres partiendo del éter enantioméricamente de sililo

Una mezcla de 150 mg de éter de sililo, 0.5 mililitros de cloruro ácido y 0.4 mililitros de TBAF (1M en THF), en 5 ml de THF, fue calentada para hacer reflujos bajo nitrógeno durante 3-4 horas. El TLC mostró un monto pequeño de producto formado. Una porción fue tomada, pasada a través de un tapón de sílice y analizada por medio de GC quiral.

#### Ejemplo 24

##### Desarrollo analítico para el Compuesto 13

Un ensayo GC quiral fue desarrollado para separar los enantiómeros del compuesto 13. Refiérase a la figura 1G. Los detalles de las condiciones del ensayo son los siguientes:

##### Condiciones GC:

30	<b>Columna:</b>	Chirasil DEX CB
	<b>Dimensiones:</b>	25m x 0.25mm
	<b>Programa de temperatura:</b>	140 °C durante 8 minutos luego a 200 °C a 15 °C/minuto
35	<b>Gas portador:</b>	helio @ 20 psi
	<b>Detección:</b>	FID @ 200°C

##### Tiempos de retención: pico 1 - 6.5 minutos pico 2 - 6.8 minutos

Adicionalmente, un ensayo GC aquiral fue desarrollado para determinar la pureza del Compuesto 13. Refiérase a la figura 1H. Los detalles de la condición de este ensayo son las siguientes:

##### Condiciones GC:

45	<b>Columna:</b>	J&W Scientific DB5
	<b>Dimensiones:</b>	15m x 0.25mm
	<b>Grosor de lámina:</b>	0.25 mm
	<b>Programa de temperatura:</b>	40 °C durante 5 minutos luego a 200 °C a 10 °C/minuto
50	<b>Gas portador:</b>	helio @ 12 psi
	<b>Detección:</b>	FID @ 200°C
	<b>Tiempo de retención:</b>	Compuesto 3 - 17.80 minutos

#### Examinación enzimática

La estabilidad del éster de n-butanoato se determinó como significativamente mejor a un pH 6. Por lo tanto, para la examinación del éter de sec-butanoato, el Compuesto 13, se utilizaron condiciones similares. El compuesto racémico 13 fue examinado para detectar hidrólisis enzimáticas con lipasas, proteasas y estereasas disponibles comercialmente. Todas las reacciones con lipasas fueron ejecutadas en la presencia de 40 µl del compuesto 13, 5 ml de MTBE, 5 ml de amortiguador de fosfato con pH 6:20 por ciento (masa) de enzimas. Las reacciones de las estereasas y las proteasas fueron realizadas sin la presencia de MTBE. Las mezclas fueron agitadas en una incubadora a 30 °C y monitoreadas por medio de TLC y GC quiral. El producto alcohólico, tal como los otros ésteres, es inestable tal como fue descrito previamente. Por lo tanto, ningún ensayo quiral del producto fue posible y las conversiones no pudieron ser calculadas. Para la examinación se observó si algún sustrato está presente todavía por medio de análisis TLC. Los mejores resultados de la examinación se muestran en la tabla 18 a continuación.

**Tabla 18:** Examinación de enzimas comerciales del compuesto 13

	<b>Enzima</b>	<b>Tiempo</b>	<b>ees/%</b>	<b>Comentarios</b>
5	Quirazima-L2	1 hora	81	Pico uno
		5 horas	-	no queda suficiente sustrato
10	Lipasa F-DS	1 hora	10	Pico uno
		1 semana	46	sustrato presente
	Proteasa ácida DS	24 horas	49	Pico uno
		120 horas	-	no queda suficiente sustrato
Lipasa PS	5 horas	44	Pico uno	
	24 horas	-	no queda suficiente sustrato	
15	Quirazima L9	24 horas	42	Pico uno
		120 horas	-	no queda suficiente sustrato
20	Proteasa Ácida A	24 horas	23	Pico uno
		120 horas	-	no hay sustrato
20	Lipasa M	24 horas	28	Pico uno
		1 semana	30	sustrato presente
	Proteasa M	5 horas	19	Pico uno
1 semana		30	no mucho sustrato presente	
25	Proteasa P "Amano" 6	24 horas	21	Pico uno
		1 semana	33	no mucho sustrato presente

30 Las siguientes enzimas dieron menos reacciones selectivas con el Compuesto 13 (ees <20%): lipasa DS; lipasa AY; lipasa F; lipasa cono N; lipasa inmovilizada SAWA; Quiroclec-PC; lipasa MY; proteasa B; Newlasa F; Alcalasa; lipasa R; PPL; lipasa G; PLE; Quirazima-E1; lipasa A "Amano" 6; lipasa A "Amano" 12; lipasa AP6; Sigma CCL; QuirazimaL5; QuiroCLEC-CR; peptidasa R; proteasa ácida A-DS; proteasa N; proteasa A2G; proteasa NL; proteasa DS; proteasaS; Prozima 6; Proleather; bromelina-F; papaína W-40 (Amano); papaína (Sigma); proteasa X; proteasa XXXI; Savinasa; Esperasa; Pepsina; QuiroCLEC-BL; Quirazime-E2; y  $\alpha$ -Quimotripsina.

35 Desde la **Tabla 19** puede observarse que todas las enzimas dejaron selectivamente el pico 1 en el ensayo GC quiral, afortunadamente correspondiendo al enantiómero deseado. Ninguna de las enzimas examinadas fue selectiva para el pico 2. 4 enzimas fueron escogidas para re-examinarse con cargas inferiores, los resultados de los cuales pueden ser vistos en la tabla. La más prometedoras de estas fue la Quirazima-L2, que deja un éster residual con un 90% de ee después de 5.5 horas.

**Tabla 19:** Re-examinación de enzimas selectivas del pico 1 para el compuesto 3

	<b>Enzima</b>	<b>Tiempo</b>	<b>ees/%</b>	<b>Comentarios</b>
45	Quirazima-L2	1 hora	21	Pico 1
		5.5 horas	90	sustrato presente
50	Lipasa PS	16 horas	65	Pico 1
		24 horas	-	sin sustrato
	Proteasa ácida DS	24 horas	42	Pico 1
48 horas		47	no queda mucho sustrato	
50	Quirazima-L9	24 horas	21	Pico 1
		72 horas	64	sustrato presente

### 55 Ejemplo 25

#### Incremento de escala de la resolución por medio de la Quirazima-L2 del Compuesto 13

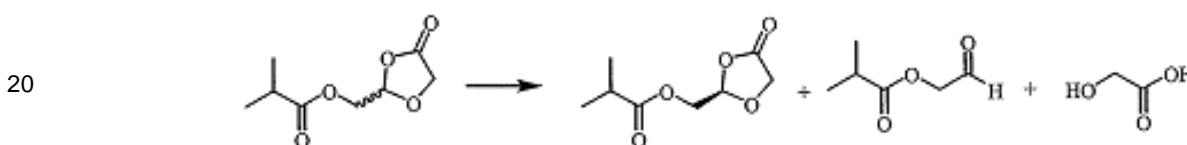
60 La resolución de la Quirazima-L2 fue incrementada de escala a 1 g, 30 mg de la enzima y 25 ml de cada una del amortiguador de fosfato pH 6 y MTBE. Después de exaltar a la reacción generó a 0.212 gramos, 21% de Th del Compuesto 13 en forma de un aceite incoloro. El espectro  $^1\text{H}$  NMR demostró un monto significativo de impurezas presentes, que había sido trasladado a desde el sustrato.

65 En una escala de 6 g, utilizando las mismas condiciones, a 20 °C la producción fue de 1.52 gramos, 25% de Th con una ee del 88% de Compuesto 3 resuelto en forma de un aceite amarillo pálido. Nuevamente el espectro  $^1\text{H}$  NMR

mostró que algunas impurezas estaban presentes. La selectividad fue mejorada a una temperatura más baja, 0 °C. Empezando desde 5.25 gramos de racemato, después de 4.5 horas la resolución generó 1.48 gramos, el 28% de Th de un ee del 92% del compuesto 3. La configuración fue confirmada como el (R)-enantiómero requerido.

5 Inicialmente la bioresolución fue realizada a una concentración moderada, 20 g/litros. Para estudiar el efecto del incremento de la eficiencia del volumen, la resolución fue repetida en una escala de 1 g a 50 g/litros, a 0 °C en un amortiguador fosfato pH 6 y MTBE. Después de 4.5 horas, la biotransformación generó 0.44 gramos, el 44% de Th, de material en forma de un aceite amarillo pálido con un ee del 92%. A partir de esto se concluyó que la eficiencia de volumen podría ser mejorada sin pérdidas significativas en la selectividad.

10 La pureza del producto obtenido por medio de estos procesos fue poca. Algunas impurezas fueron transportadas desde el racemato. Para una bioresolución de una selectividad moderada la conversión puede ser incrementada opcionalmente para adquirir una alta pureza enantiomérica de un éster residual. Una de las impurezas, el éster de 2-metilpropanoato de hidroxiacetaldehído mostrado en el Esquema 14, estuvo presente en el racemato. Sin embargo, no fue claro si esto fue producido en la bioresolución, tal como se señala más adelante.



Esquema 14: Formación de impurezas

25 Para determinar si cualquier aldehído adicional fue generado durante la biotransformación, la resolución fue repetida en la misma escala (1 g) utilizando lactona destilada, que no contenía aldehídos. Esta reacción generó 0.29 gramos, 29%, del producto con un 93% de ee. El espectro <sup>1</sup>H NMR demostró que el aldehído estuvo presente; claramente este material es producido durante la reacción o durante el exaltamiento.

30 Cambiando el solvente a tolueno resultó en una resolución más lenta, pero más efectiva. A la escala de 1 g, 50 g/litros, la reacción fue exaltada después de 22.5 horas para generar 0.30 gramos, 30% de producción de un éster con un ee >99%. La concentración fue incrementada aún más a 200 g/litro, utilizando 4 g de racemato, en 10 ml de cada uno de amortiguador fosfato pH 6 y tolueno, a 0 °C. El proceso fue altamente eficiente en lo que se refiere al volumen, y no se encontraron problemas. Después de 17 horas la biotransformación generó 1.11 gramos, 28%, del producto con un ee del 95%.

35 Algunas reacciones fueron realizadas en una escala ligeramente más grande (2-10 g) utilizando diferentes cargas enzimáticas y tiempos de reacción; los resultados fueron resumidos en la tabla 10 más adelante. La tasa de reacción no fue completamente predecible. Algunos factores podrían ser responsables de esto, incluyendo diferentes lotes de racemato con diferentes perfiles de impurezas y diferencias en las mezclas del sistema enzimático inmovilizado por el solvente bifásico. Las producciones podrían ser engañosas debido a impurezas transportadas desde el racemato. Se descubrió a esta escala que lavados de tiosulfato como el biocarbonato y ácidos no redujeron significativamente el monto de las impurezas de aldehídos. El procedimiento de exaltación requirió algo de clarificación, pero en esta etapa se esperó que una combinación de un lavado adecuado y una destilación de Kugelrohr (lámina limpiada a escala) después de la resolución sería efectiva. Esto fue investigado posteriormente a una escala más larga. Todas estas biotransformaciones usaron el sistema bifásico tolueno-amortiguador a 200 g/litros.

Tabla 10: Resolución por Quirazima-L2 del Compuesto 3

50

Registro	Carga enzimática / porcentaje masa	Escala/gramos	Tiempo/horas	Producción/porcentaje	ee/porcentaje
55	1	4	112	19	98
	2	8	16	22	73
	2	2	47	29	93
60	2.5	10	15	20	>99
	10	10	4	ND	96

65 El proceso fue incrementado de escala a 30 g utilizando 10% masa de las enzimas a 0 °C, 200 g/litros. Después de

una destilación Kugelrohr se recuperaron 4.2 gramos con un ee >95%.

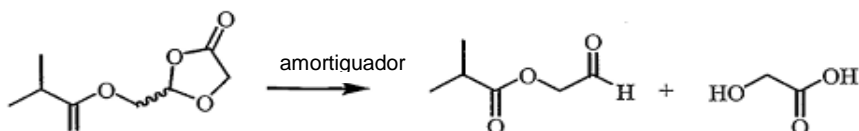
Tal como se mencionó anteriormente, la pureza del racemato es vital para la calidad y para la producción obtenible después de la biotransformación. Además, es difícil determinar la selectividad verdadera de una resolución con una conversión precisa. Esto no está disponible en la información del exceso enantiomérico puesto que el producto de la bioresolución no puede ser aislado; la única información disponible es el exceso enantiomérico de sustrato residual. Una idea de selectividad es ganada de la producción del éster, pero puesto que está contaminado con impurezas, la precisión es dudosa.

Cuando se considera el proceso final, podría ser ventajoso utilizar un racemato crudo y purificarse después de la bioresolución, por ejemplo, por medio de una destilación de limpieza de lámina. Sin embargo, impurezas podrían inhibir a la enzima. La posibilidad de que un proceso así que utilice un sustrato muy crudo fue investigado; una mezcla de racematos que contenía a DME, agua y otras impurezas, que contenía aproximadamente 1 g de sustrato fue utilizada en la bioresolución. Durante la biotransformación ninguna base fue consumida y de esa forma se agregaron las enzimas. Una porción fue removida después de 16 horas y se encontró que era racémica. Estos hallazgos sugerirían que la enzima estaba siendo "eliminada" por las impurezas presentes en la mezcla. Por lo tanto, en una sección, la purificación de sustrato es preferible antes de la bioresolución.

### Ejemplo 26

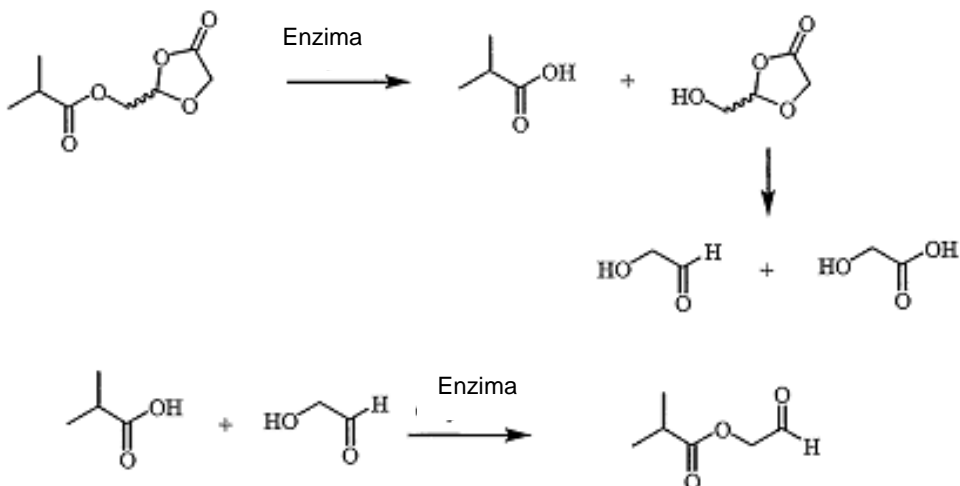
#### Biotransformación en 2-propanolol-agua

Tal como fue mencionado anteriormente, la estabilidad del sustrato fue un problema potencial. Un proceso de fondo en el cual la lactona es abierta a un ácido glicólico y el éster de 2-metilpropanoato de hidroxiacetaldehído no puede ser descartado (Esquema 15).



Esquema 15: Apertura anular de la lactona

La modalidad de acción de la enzima en el Compuesto 13 también es conocida. Los únicos productos detectados después de la bioresolución son el éster de 2-metilpropanoato de hidroxiacetaldehído y el ácido glicólico. Sin embargo, la modalidad usual de acción para una lipasa es hidrolizar el éster; esto generaría a la lactona y al ácido 2-metilpropiónico (Esquema 16). El producto alcohólico de la lactona no es detectado y se descompone al ácido glicólico y al hidroxiacetaldehído. Si este mecanismo es correcto, entonces el aldehído esterificado debe venir de la reacción del hidroxiacetaldehído con el ácido 2-metilpropiónico. Un mecanismo alternativo es que la enzima podría actuar directamente para abrir la lactona sin dividir primero al éster. Esta modalidad de acción por la cual un anillo de lactona es abierto se ha observado para la estereasas del hígado (refiérase, por ejemplo: Fouque y G. Rousseau Synthesis (Síntesis) 1989, 661; y P. Barton y M. I. Page J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1993, 2317), pero tal vez esto sea poco posible en este caso.



Esquema 16: Posible mecanismo de reacción



- El uso de aditivos en biotransformaciones ha sido ampliamente reportado por mejorar las selectividades, pero sus efectos en el exceso enantiomérico son usualmente impredecibles. Refiérase por ejemplo: T. V. Hansen, V. Waagen, V. Partali, H. W. Anthonsen y T. Anthonsen, *Tetrahedron Asymmetry* (Asimetría del Tetraedro) 1995, 6, 499; G. Duan y J. Y. Chen, *Biotechnology Letters* (Cartas de Biotecnología) 1994, 16, 1065; N. W. Boaz y R. L. Zimmerman, *Tetrahedron Asymmetry* (Asimetría del Tetraedro) 1994, 5, 153; y K. Faber, G. Ottolina y S. Riva, *Biocatalysis* 1993, 8, 91. La modalidad de acción a menudo no es clara; el aditivo podría estar actuando como un catalizador de transferencia de fase, como un modificador enzimático, o como una alternativa al agua como por ejemplo un nucleófilo. En la resolución de (-)-2',3'-dideoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina (FTC, también conocida como Coviracil™ y emtricitabina), se encontró que las mezclas de alcohol: agua fueron una buena alternativa a los sistemas bifásicos normales o principalmente acuosos. Se visionó que esto también podría ser efectivo en la resolución del Compuesto 13, en relación a la selectividad enzimática y la estabilidad del sustrato. Esta hipótesis fue probada utilizando 1 g del Compuesto 13, con un 3% masa de la enzima, a 100 gL<sup>-1</sup> en un sistema solvente de 8:22-propanolol: agua. Después de 47 horas la reacción generó 0.47 gramos de material, 37% de TH con un ee >98%.
- El resultado inicial en 2-propanolol-agua se veía excelente, aunque el agua y el aldehído pueden haber impulsado la producción. Resultados más significativos fueron obtenidos en una escala superior, con destilación para purificar el producto. El racemato fue destilado utilizando destilación por medio de limpieza de láminas. Las condiciones fueron 30 g de racemato en 9:1 2-propanolol (IPA)-agua, a 200 gL<sup>-1</sup> con una carga enzimática de 5% masa. Esta reacción fue filtrada después de 10 horas y reducida al vacío. El exceso enantiomérico fue determinado como un 94%. Este material fue dividido en 2 lotes para investigar los métodos de purificación. La primera porción fue destilada usando el aparato Kugelrohr A 133 °C/1.3 de Torr para dar 2 fracciones requeridas:
- Fracción 1: 10.8 gramos que contenían un 61% de aldehído, un 31% del compuesto 3 y un monto no determinado de ácido glicólico. Mayor destilación a 80 °C/4-5 Torr para remover el aldehído y un lavado de agua dieron 4.4 gramos del Compuesto 3 con un 90% de pureza de material conteniendo un 4% de aldehído.
- Fracción 2: 2.7 gramos que no contenían aldehídos, pero un monto significativo de ácido glicólico y el compuesto 3. Después de un lavado con agua, se obtuvieron 1.8 g del Compuesto 3 con un 91% de pureza (por medio de GC).
- La 2ª porción del material crudo fue lavada con agua antes de la destilación a 140 °C/1.6 Torr seguido de la remoción del aldehído a 60 °C/1.6 Torr, generando 5.2 gramos del material con un 89% de pureza, conteniendo un 6% de aldehído.
- Por lo tanto en total 11.4 gramos del éster de 2-metilpropanoato fue producido con un 90% de pureza, con una ee del 94%, correspondiendo a una producción general excelente del 38%. Éste procedimiento claramente tuvo un mejor rendimiento que con tolueno: amortiguador y con mayor optimización podría suministrar una ruta eficiente para la lactona ópticamente pura.

## Ejemplo 27

### Experimental - Resolución de 30 g del Compuesto 13 con Quirazima-L2 en 2-propanolol: agua

- Un matraz revestido de 50 ml a 0 °C fue cargado con 2-propanolol (135 ml), agua (15 ml) y el Compuesto racémico 13 (30 g, DB/1005/85/1). La mezcla fue agitada y se agregó Quirazima-L2 (1.5 gramos, 5% masa) a la mezcla. El ee fue medido en intervalos al remover las porciones de la solución, extrayéndolas con acetato etílico, secándolas (MgSO<sub>4</sub>), y analizándolas por medio de un GC quiral. Después de 10 horas, el ee fue del 93%. Poco después la mezcla fue filtrada por medio de Celite® y concentrada al vacío para generar 32.1 g del Compuesto 3 crudo en forma de un aceite amarillo pálido. El aceite fue disuelto entonces en tolueno y concentrado (2 x 250 mL) para remover cualquier agua en una forma azeotrópica. Una producción cruda de 29.4 gramos, 98%; ee de 94%.
- Este aceite fue dividido en 2 porciones. El primero fue destilado utilizando el aparato Kugelrohr A 133 °C/ 3 Torr, que dio tres fracciones en general. La fracción uno (la más volátil) contenía 10.8 gramos de 61% de aldehído, 31% de lactona y 8% de otras impurezas. La fracción 2 contenía 2.7 gramos de lactona contaminada con un monto significativo de ácido glicólico y la fracción 3 contenía impurezas amarillas de volatilidad baja. La fracción 2 fue disuelta en tolueno (200 ml), lavada con agua (200 ml), secada (MgSO<sub>4</sub>) y concentrada al vacío para generar 8 g del Compuesto 13 en forma de un aceite incoloro con un 91% de pureza por medio de GC (no se observó ningún aldehído). La mayoría del aldehído en la fracción 1 fue removida entonces por medio de la destilación Kugelrohr a 80 °C/4-5 Torr para dar, un residuo, de 6.1 g de lactona que contenía alrededor del 12% de aldehído y un monto indeterminado de ácido glicólico. Este material fue disuelto entonces en tolueno (200 ml), lavado con agua (200 ml), secado (MgSO<sub>4</sub>) y concentrado al vacío para generar 4.4 gramos del Compuesto 3 en forma de un aceite incoloro con un 90% de pureza, un 4% de aldehído por medio de GC.
- La 2ª porción del material fue disuelta en tolueno (200 ml) lavada con agua (200 ml), secada (MgSO<sub>4</sub>) y concentrada al vacío. El aceite resultante fue destilado entonces utilizando el aparato Kugelrohr a 140 °C/1.6 Torr, para remover impurezas de baja volatilidad, y entonces destilado aún más a 60 °C/1.3 Torr para remover cualquier aldehído residual. El material recuperado de esta destilación fue determinado como 5.15 gramos con un 89% de pureza, 6%

de aldehído por medio de GC.

Producción general: 11.4 gramos, 38%; pureza por medio de GC: 90%.

## 5 Ejemplo 28

### Examinación enzimática microbiana

10 En relación a los Compuestos 11 y 12, el compuesto 13 fue examinado en placas de cultivo de 96 pozos. Las muestras fueron expuestas a ensayos por medio de un GC quirál; debe mencionarse que el método de GC quirál de alto caudal utilizado sólo puede dar valores aproximados. Los resultados de la examinación son representados en la figura 3E.

15 Un número grande de cepas mostraron una actividad en el Compuesto 13, con selectividades para los picos 1 y 2 siendo observados en los cromatogramas GC. Aquellos que dieron un exceso enantiomérico superior a 40% de ee se muestran en la tabla 21.

**Tabla 21:** Examinación microbiana del compuesto 13

20

<b>CMC No</b>	<b>Cepa</b>	<b>ee del Sustrato/porcentaje</b>	<b>Comentarios</b>
103127	<i>Serratia liquifaciens</i>	42	Pico 1
25 103869	No identificada	44	Pico 1
103355	No identificada	54	Pico 1
103032	<i>Bacillus licheniformis</i>	43	Pico 1
30 103063	No identificada	74	Pico 1
103071	No identificada	75	Pico 1
103095	<i>Nocardia sp.</i>	54	Pico 1
35 103134	No identificada	48	Pico 1
103146	<i>Pseudomonas sp.</i>	46	Pico 1
103188	<i>Pseudomonas putida</i>	46	Pico 2
40 103322	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	70	Pico 1
103419	<i>Acinetobacter sp.</i>	81	Pico 1
103422	No identificada	79	Pico 1
103423	No identificada	71	Pico 1
45 103669	No identificada	51	Pico 1
103777	No identificada	50	Pico 1
103780	<i>Streptomyces sp.</i>	49	Pico 1
50 103405	No identificada	62	Pico 1
103785	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	87	Pico 1
103869	No identificada	92	Pico 1
55 103331	<i>Candida rugosa</i>	40	Pico 1
103587	<i>Staphylococcus sp.</i>	65	Pico 1
103774	<i>Streptoverticillium cinnamoneus</i>	87	Pico 2

60 De los resultados de la examinación primaria aquellas cepas que mostraron la mejor selectividad para el pico 1 y una buena área de pico fueron examinadas nuevamente. Las cepas que re-confirmaron sus actividades se muestran en la tabla 22.

65

Tabla 22: re-examinación de las cepas para el compuesto 3

	CMC No	Cepa	ee del Sustrato/porcentaje
5	103063	No identificada	45
	103127	<i>S.liquifaciens</i>	41
10	103373	<i>Acinetobacter sp.</i>	41
	103419	<i>Acinetobacter sp.</i>	14
	103552	No identificada	31
15	103606	<i>Acinetobacter junii</i>	21
	103635	No identificada	44
	103661	<i>S. cerevisiae</i>	47
20	103777	No identificada	18
	103869	No identificada	65

25

**Ejemplo 29**

30

**Incremento de escala de las biotransformaciones para CMC 103869 y 103661**

35

40

45

A partir de la examinación, 2 cepas fueron seleccionadas para un incremento de escala. Estas fueron CMC 103869 (no identificada) y CMC 103661 (*S. cerevisiae*). Cultivos de ambas fueron sembrados y sus pastas celulares fueron cosechadas y almacenadas a -20 °C. Las biotransformaciones fueron establecidas a una escala de 30 ml, utilizando un control del pH y de la temperatura. Las Biotransformaciones iniciales fueron en 0.1M de Tris-HCl, pH 7. Se observaron malos excesos enantioméricos y estabilidades de los sustratos, posiblemente debido al alto pH. El reducir el pH a 6 incremento parcialmente la selectividad, pero todavía existían problemas de estabilidad de los sustratos. Un cambio en el amortiguador a 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, incrementó aún más el exceso enantiomérico. Los resultados para ambas cepas son resumidos en la **figura 4**. La resolución del Compuesto 13 con CMC 103869 dio un este residual con un 70% de ee. Los resultados con CMC 103661 fueron desalentadores y por lo tanto estudios adicionales con esta cepa fueron abandonados. Para todas las biotransformaciones se observó una pérdida del sustrato residual, posiblemente debido a una 2ª enzima o una mala estabilidad de sustrato a 25°C. Finalmente, al reducir la temperatura a 10 °C, la selectividad se incrementó a una ee de ≥95%, sin embargo, todavía existía una pérdida total del sustrato a lo largo del tiempo. La conversión y por lo tanto la selectividad absoluta no son conocidas.

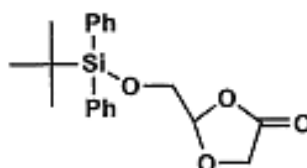
50

55

La CMC 103869 fue cultivada en un medio de TSB y la CMC 103661 fue cultivada en un medio de YM en matraces. Ambas cepas fueron cultivadas a 25 °C y las células fueron cosechadas por medio de centrifugación (2000 g durante 20 minutos a 4 °C). Las pastas celulares fueron almacenadas a -20 °C. Las biotransformaciones fueron ejecutadas en matraces recubiertos de 200 ml con un agitador magnético, con un control de temperatura y de pH (con 1N de NaOH). Las pastas celulares fueron re-suspendidas a 10 °C masa/volumen en 0.1 M de amortiguador de Tris-HCl (ajustado al pH requerido), o 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6. El sustrato, el amortiguador y la pasta celular fueron agregados al matraz y las muestras fueron tomadas para análisis por medio de GC quiral por medio de dilución al MTBE.

**Ejemplo 30**

60



65

**Compuesto 4**

**Desarrollo analítico para el Compuesto 4**

Las condiciones para el método de HPLC del ensayo quiral del análisis fueron reproducidos para dar la resolución mostrada en la cromatografía que se muestra más adelante:

**Condiciones HPLC:**

<b>Columna:</b>	Chiralcel OJ
<b>Dimensiones:</b>	250 x 4.6mm
<b>Fase móvil:</b>	85% de heptano 15% de EtOH
<b>Caudal:</b>	1.0 mililitros/minuto
<b>Detección:</b>	UV @ 254 nm
<b>Tiempos de retención:</b>	<b>1 - 7.47 minutos</b> <b>2 - 11.16 minutos</b>

Bajo las condiciones del ensayo las formas de los picos de los enantiómeros fueron un poco amplias (**figura 1K**), por lo tanto, se realizó un intento de mejorar este ensayo. Esto se logró al utilizar una cromatografía de fluidos súper críticos (SFC - supercritical fluid chromatography), con los isómeros dando picos angostos que fueron resueltos completamente en 4 minutos. Refiérase a la **figura 1L**.

**Condiciones optimizadas de SFC:**

<b>Columna:</b>	Chiralcel OJ (250 x 4.6 mm)
<b>Fase móvil:</b>	95% de CO <sub>2</sub> , 5% de MeOH
<b>Caudal:</b>	3.0 mL/min
<b>Presión:</b>	3000psi
<b>Temperatura de la columna:</b>	35 °C
<b>Tiempos de retención:</b>	<b>1 - 2.73 minutos [(-)-enantiómero]</b> <b>2 - 3.28 minutos [(+)-enantiómero]</b>

**Bioresolución del compuesto 4**

Durante el estudio de la biotransformación del Compuesto 1, se descubrió que el material era susceptible a hidrólisis no enzimática. Esto puede deberse a la alta volatilidad del Compuesto 1 hacia la hidrólisis y la inestabilidad del producto postulado de lactona-alcohol, que un posible sendero para la biotransformación se estaba abriendo de la lactona antes de la saponificación del butirato. Si esto era verdad, entonces la resolución enzimática del Compuesto 4 podría ser posible. Por lo tanto, la reactividad el Compuesto 4 fue probada con las lipasas PS, PPL, M, MY y la lipasa inmovilizada SAWA, en tolueno-amortiguador de pH 7 a 20 °C. Ninguna reacción fue observada (TLC, 24 horas). La reacción enzimática procedió primero por una división del butirato y luego una posible apertura de la lactona.

**Estudios conglomerados**

Los espectros IR del racemato en un solo enantiómero del compuesto 4 fueron comparados y se encontró que eran similares, pero no idénticos.

Los puntos de derretimiento de cada uno de estos compuestos fueron determinados entonces por medio de una calorimetría de escaneo diferencial (DSC - differential scanning calorimetry) y se encontró que daba inicio al derretimiento a los 91.7 °C para el racemato y 81.1 grado Celsius para el (-)-enantiómero (ee del 98.7 por ciento). La comparación de estos puntos de derretimiento revela que el racemato tiene un punto de derretimiento más alto que el enantiómero individual. Para que un compuesto sea un conglomerado el espectro IR del racemato y el enantiómero individual deben ser idénticos y el punto de derretimiento del racemato se requiere que sea el punto más bajo en el diagrama de la fase. Por lo tanto, este compuesto claramente no es un conglomerado.

Subsiguientemente, se constituyó un diagrama de la fase para el Compuesto 4. La posición de la eutéctica fue determinada, sobre la cual el punto de ee de este compuesto podría ser mejorado en relación a su pureza enantiomérica por medio de cristalización. Esta información del diagrama de la fase tenía que obtenerse al analizar los puntos de derretimiento (nuevamente por medio de DSC) de las muestras de excesos enantioméricos que difieren en incrementos de ee del 10%. Estas muestras fueron preparadas inicialmente al disolver los montos requeridos de racemato y un enantiómero individual en acetona y removiendo el solvente. Este método fue exitoso para las muestras con ee del 10%, del 80% y del 90%, con los vestigios DSC que contenían sólo un pico. Para todas las otras muestras, sin embargo, se observaron 2 picos por medio de DSC (posiblemente debido a polimorfos). Varios métodos para producir estas muestras fueron intentados para combatir este problema. Éstos incluyeron derretimiento de la muestra; disolución en acetona y por medio de calefacción O/N a 65 °C; derretimiento y calefacción durante la noche a 65 °C y el uso de diclorometano como el solvente; pero el DSC todavía dio 2 picos.

Por lo tanto, el diagrama/la eutéctica de la fase no pudo determinarse por medio de este método. Adicionalmente, puesto que el compuesto era extremadamente soluble y solamente 1 g del racemato y cada uno de los enantiómeros individuales estaban disponibles, los estudios de solubilidad fueron descartados. Sin embargo, puesto que sólo un pico fue dado por las muestras de racemato y de enantiómeros originales por medio de DSC, los puntos de derretimiento y los valores de entalpía de estas muestras podrían determinarse. Esto permitió que solo pueda construirse el diagrama de la fase teóricamente (J. Jacques, A. Collet y S.H. Wilden, Enantiomers, Racemates and Resolutions (Enantiómeros, Racematos y Resoluciones), Nueva York: Wiley, 1981).

La ecuación de Schroder-Van Laar puede ser utilizada para calcular la curva de líquidos entre el enantiómero puro y la eutéctica para un compuesto racemato verdadero utilizando el punto de derretimiento y la entalpía de la fusión del enantiómero puro:

$$\ln x = \frac{\Delta H_A^f}{R} \left( \frac{1}{T_A^f} - \frac{1}{T^f} \right)$$

Fracción de moles;

0.9	$T_f = 351.64 \text{ K}$	$78.64^\circ\text{C}$
0.8	$T_f = 346.60 \text{ K}$	$73.60^\circ\text{C}$
0.7	$T_f = 341.05 \text{ K}$	$68.05^\circ\text{C}$
0.6	$T_f = 334.86 \text{ K}$	$61.86^\circ\text{C}$

Luego la parte de la curva por debajo de la cual consiste la fase sólida del compuesto racémico puro puede determinarse utilizando la siguiente ecuación (Prigogine-Defay):

$$\ln 4x(1-x) = \frac{2\Delta H_R^f}{R} \left( \frac{1}{T_R^f} - \frac{1}{T^f} \right)$$

Fracción de moles;

0.9	$T_f = 349.26 \text{ K}$	$76.26^\circ\text{C}$
0.8	$T_f = 360.81 \text{ K}$	$87.81^\circ\text{C}$
0.7	$T_f = 366.53 \text{ K}$	$93.53^\circ\text{C}$
0.6	$T_f = 369.41 \text{ K}$	$96.40^\circ\text{C}$

donde:

X = fracción de moles del enantiómero más abundante ( $0.5 \leq x \leq 1$ ) de una mezcla cuyo derretimiento se determina en  $T_f$  (K).

$\Delta H_A^f$  = Entalpía de la fusión de un solo enantiómero (J.mol<sup>-1</sup>).

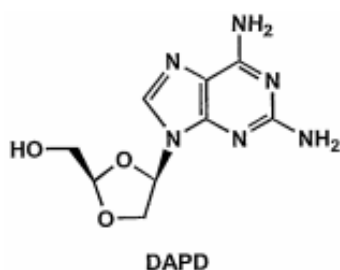
$\Delta H_R^f$  = Entalpía de la fusión del racemato (J.mol<sup>-1</sup>).  $R = 8.31$  (J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>).

$T_A^f$  = Punto de derretimiento de un solo enantiómero (K) puro.

$T_R^f$  = Punto de derretimiento del racemato (K).

Ambas de estas curvas fueron dibujadas en el mismo gráfico para dar este diagrama de fase. El punto en el cual las líneas se cruzan es la eutéctica, que en este caso es un ee del 77.5 por ciento. Refiérase a la **figura 4**.

### Ejemplo 31



**Desarrollo analítico para DAPD**

Se desarrollaron ensayos quirales para *cis*-DAPD y su éster de butirato para analizar una examinación de esterificación enzimática del DAPD. Refiérase a la **figura 1M**.

**Condiciones SFC para DAPD:**

<b>Columna:</b>	Chiralpak AD
<b>Dimensiones:</b>	250 x 4.6 mm
<b>Fase móvil:</b>	70% de CO <sub>2</sub> , 30% de MeOH con 0.1% de TEA
<b>Caudal:</b>	3.0 mL/min
<b>Presión:</b>	3000psi
<b>Temperatura de la columna:</b>	35 °C
<b>Detección:</b>	UV @ 254 nm
<b>Tiempos de retención:</b>	<b>1 - 3.57 minutos</b> <b>2 - 5.64 minutos</b>

Para monitorear el progreso de la biotransformación para el material DAPD, el ensayo que se acaba de mencionar fue modificado para incluir la resolución de la línea base del DAPD y del butirato. Refiérase a la **figura 1N**. Las condiciones y el cromatograma son las siguientes:

**Condiciones SFC para el DAPD y el Ester de butirato**

<b>Columna:</b>	Chiralpak AD
<b>Dimensiones:</b>	250 x 4.6 mm
<b>Fase móvil:</b>	80% de CO <sub>2</sub> , 20% de MeOH con 0.1% TEA
<b>Caudal:</b>	3.0 mL/min
<b>Presión:</b>	3000psi
<b>Temperatura de la columna:</b>	35 °C
<b>Detección:</b>	UV @ 254 nm
<b>Tiempos de retención:</b>	<b>1 - 4.49 minutos 2 - 5.90 minutos</b> <b>3 - 9.18 minutos 4 - 11.0 minutos</b>

**Resolución enzimática del DAPD**

Se realizó una examinación enzimática limitada dirigida para resolver los isómeros de *cis*-DAPD por medio de la transesterificación utilizando butirato de vinilo. Las enzimas fueron escogidas en base a la actividad de transesterificación conocida. Los solventes investigados fueron tolueno (sustrato insoluble), DMF y pirimidina (sustrato soluble). Las reacciones fueron seguidas por medio de TLC y el exceso enantiomérico fue medido mediante una cromatografía de fluidos súper críticos (SFC - supercritical fluid chromatography) (Chiralpak AD). Como una confirmación, el exceso enantiomérico también fue medido utilizando un ensayo de HPLC (100% de MeOH, Chiralpak AD) y estuvieron de acuerdo con los resultados de SFC.

Para cada enzima: al *cis*-DAPD (TP0041/97/D-1, 10 mg, 0.04 mmol) racémico se agregó solvente (1 ml) (tolueno, DMF o pirimidina, refiérase a la **tabla 3C**), butirato de vinilo (0.1 ml, 0.8 milimoles) y luego la enzima (5-10 mg). Los matraces fueron agitados en una incubadora a 30 °C y se expusieron ensayos periódicamente al remover porciones de 50 µl, diluyéndose con etanol y analizándose por medio de TLC (10:1:0.1 EtOAc: MeOH: H<sub>2</sub>O) y por medios quirales. La **tabla 23** muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 23:** Examinación enzimática para la acilación de DAPD

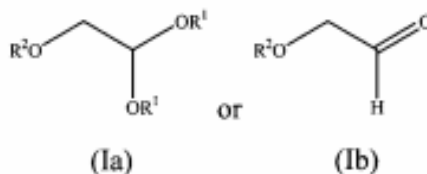
Enzima	Solvente	Tiempo	ees	eep	Comentarios
Quirazima-L2	Tolueno	2 horas	4%	7%	1 producto (conversión <50%)
		20 horas	8%	10%	2 productos (conversión -50%)
Quirazima-L9	Tolueno	2 horas	Rac	18%	1 producto (conversión <50%)
		20 horas	Rac	10%	2 productos (conversión -50%)
Lipasa AY	Tolueno	2 horas	7%	3%	1 producto (conversión -50%)
		20 horas	11%	6%	1 producto (conversión >50%)
Lipasa AK	Tolueno	2 horas			Sin reacción
		20 horas	Rac	Rac	1 producto (conversión <50%)
Lipasa PS	Tolueno	2 horas	Rac	12%	1 producto (conversión <50%)
		20 horas	Rac	14%	1 producto (conversión <50%)
Alcalasa (inmovilizada)	DMF	2 horas			Sin reacción
		20 horas	9%	10%	1 producto (conversión <50%)
Subtililina carlsberg tipo VII	DMF	2 horas			Sin reacción
		20 horas	Rac	Rac	1 producto (conversión <50%)
PeptiCLEC-BL	Pirimidina	2 horas	-	Rac	1 producto (conversión del 100%)
	Pirimidina (menos enzimas que aquellas mencionadas anteriormente)	2 horas	Rac	10%	1 producto (conversión <50%)
PeptiCLEC-BL	Tolueno	4 horas	Rac	Rac	1 producto (conversión del < 50%)
		24 horas	Rac	12%	1 producto
Proteasa N	Tolueno	24 horas			Sin reacción
	DMF	24 horas	Rac	11%	1 producto (conversión <50%)
PLE	Tolueno	24 horas			Sin reacción
PPL	Tolueno	24 horas			Sin reacción

Los resultados mostrados en la Tabla 23 muestran que, aunque la esterificación de DAPD ocurre, no es una reacción enantioselectiva. El TLC mostró que más de un producto fue formado en algunos casos. Sin embargo, para el PeptiCLEC-BL y la lipasa AY, solamente se formó el butirato deseado en una reacción rápida, por lo tanto, estas serían buenas enzimas para poner ésteres regioselectivamente y moderadamente en el oxígeno.

**Reivindicaciones**

1. Un proceso para preparar un nucleósido de β-D- o β-L-1,3-dioxolano sustancialmente puro que comprende:

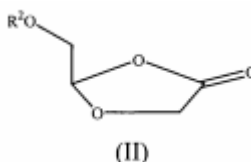
- a) Obtener un etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) o el compuesto de la fórmula (Ib):



Donde:

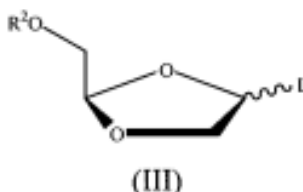
cada R<sup>1</sup> es independientemente un alquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterocíclico, un alcarilo, un alquilheteroarilo o un alquilheterocíclico, o un aralquilo; y R<sup>2</sup> es un grupo removible adecuado;

- b) Ciclizar el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) o del compuesto de la fórmula (Ib) con ácido glicólico para obtener una lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II):



- c) Resolver la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) para obtener una D- o L-lactona sustancialmente pura;

- d) Reducir selectivamente con un agente reductor y activar la lactona D- o L- quiral sustancialmente pura para obtener una D- o L-1,3-dioxolana sustancialmente pura de la fórmula (III):



Donde L es un grupo que deja adecuado;

- e) Acoplar al D- o L-1,3-dioxolano sustancialmente puro de la fórmula (III) a una base purina o pirimidina activada y/o protegida de su derivado para obtener una mezcla α:β de nucleósidos de D- o L-1,3-dioxolano sustancialmente puros protegidos de la fórmula (IV):

donde B es una base purina o pirimidina o su derivado;

- f) Opcionalmente purificar a la mezcla α:β de nucleósidos de D- o L-1,3-dioxolano sustancialmente puros y protegidos de la fórmula (IV) para obtener un nucleósido de β-D- o β-L-1,3-dioxolano sustancialmente puro y protegido; y

- g) Opcionalmente desproteger el nucleósido de P-D- o P-L-1,3-dioxolano sustancialmente puro y protegido para obtener un nucleósido de β-D- o β-L-1,3-dioxolano sustancialmente puro.

2. El proceso de la reivindicación 1 donde los nucleósidos de P-D- o β-L-1,3-dioxolano sustancialmente puros son β-D-DAPD.

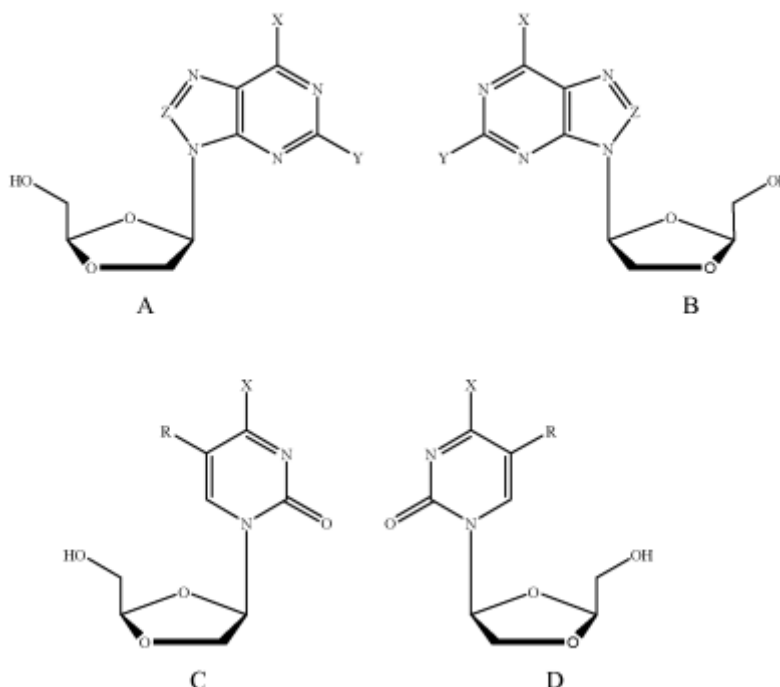
3. El proceso de la reivindicación 1 donde el paso (b) es en la presencia de un ácido de Lewis.

4. El proceso de la reivindicación 3 donde el ácido de Lewis es BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O.

5. El proceso de la reivindicación 1 donde el agente reductor en el paso (d) es LiAlH(OtBu)<sub>3</sub>.



6. El proceso de la reivindicación 1 donde el grupo que abandona adecuado es seleccionado de un grupo que consiste de O-acilo, OAc, halógeno, OMesilatos y OTolatos.
7. El proceso de la reivindicación 1 donde R<sup>2</sup> es benzoilo de iso-butirilo o p-metoxi.
8. El proceso de la reivindicación 1 donde la base purina o pirimidina activada y/o protegida o su derivado es activada por 2,6-dicloropurina.
9. El proceso de la reivindicación 1 donde el nucleósido de P-D- o β-L-1,3-dioxolano sustancialmente puro y protegido es desprotegido.
10. El proceso de la reivindicación 1 donde el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib).
11. El proceso de la reivindicación 1 donde el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib) cuando R<sup>2</sup> es benzoilo de p-metoxi.
12. El proceso de la reivindicación 1 donde el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) no es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib).
13. El proceso de la reivindicación 1 donde el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) no es hidrolizado al aldehído correspondiente de la fórmula (Ib) cuando R<sup>2</sup> es iso-butirilo.
14. El proceso de la reivindicación 1 donde la resolución de la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) se alcanza utilizando cromatografía quiral.
15. El proceso de la reivindicación 1 donde la resolución de la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) se logra utilizando una resolución enzimática.
16. El proceso de la reivindicación 1 donde los nucleósidos de β-D- o β-L-1,3-dioxolano sustancialmente puros son seleccionados de un grupo que consiste de la fórmula A a la D:



y sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables, donde:

R es independientemente H, halógenos, OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR', NR'<sub>2</sub>, alquilo inferior de C1-C4, CH<sub>3</sub>, CH=CH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>C=CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R', CONH<sub>2</sub>, CONHR', CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH=CHCO<sub>2</sub>H, CH=CHCO<sub>2</sub>R', CH=CHCl, CH=CHBr, o CH=CHI; cada R' es independientemente un alquilo inferior de C1-C4;

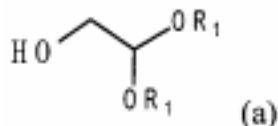
Z es CH o C-X; y  
 cada X y Y es independientemente H, un halógeno, OH, OR', OCH<sub>3</sub>, SH, SR', SCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NHR',  
 NR'<sub>2</sub>, o CH<sub>3</sub>

17. Un proceso para la preparación de β-D-DAPD sustancialmente puro, que comprende:

5

a) Proveer un compuesto de la fórmula (a):

10

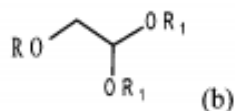


15

Donde cada R1 es independientemente un alquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterocíclico, un alcarilo, un alquilheteroarilo o un alquilheterocíclico, o un aralquilo;

b) Convertir el compuesto de la fórmula (a) a un compuesto de la fórmula (b):

20

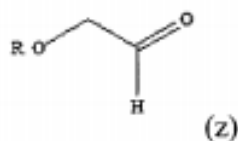


25

Donde R es un benzoilo de iso-butirilo o p-metoxi;

c) Hidrolizar el compuesto de la fórmula (b) al aldehído correspondiente de la fórmula (z):

30

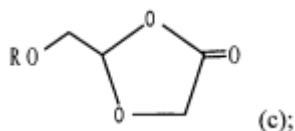


35

Donde R es benzoilo de metoxi;

d) Ciclizar el compuesto de la fórmula (b) donde R es iso-butirilo o el compuesto de la fórmula (z) donde R es bezoilo de p-metoxi a una lactona racémica de 1,3-dioxolona de la fórmula (c):

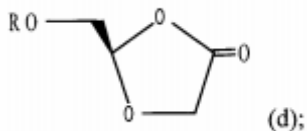
40



45

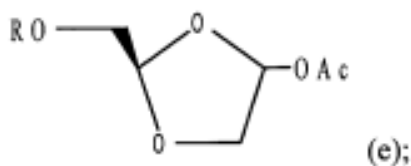
e) Resolver el compuesto de la fórmula (c) a una lactona quiral de dioxolano de la fórmula (d):

50



f) Acetilar la lactona quiral de dioxolano de la fórmula (d) a un acetato quiral de dioxolano de la fórmula (e):

55



60

g) Acoplar el compuesto de la fórmula (e) a un derivado activado de 2,6-dicloropurina para obtener una mezcla de los anómeros α y β del correspondiente nucleósido de dioxolano;

65

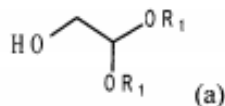
h) Purificar opcionalmente la mezcla de los anómeros α y β obtenidos en el paso (g) para generar el anómero β.

i) Convertir a los sustituyentes de 2,6-dicloropurina del paso (g) o del paso (h) a un sustituyente de 2,6-diaminopurina; y

5 j) Purificar opcionalmente y desproteger el compuesto del paso (i) para obtener dioxolano de  $\beta$ -D-2,6-diaminopurina.

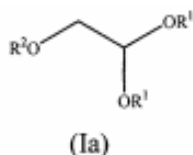
18. El proceso de la reivindicación 1 que comprende:

10 a) Suministrar un compuesto de la fórmula (a)



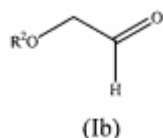
15 Donde cada  $R^1$  es independientemente Me o Et;

20 b) reaccionar el compuesto de la fórmula (a) con  $R^2$ -Cl para obtener un etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia);



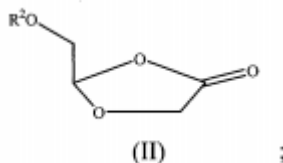
25 Donde  $R^2$  es benzoilo de iso-butirilo o p-metoxi;

30 c) Hidrolizar el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) obtenida en el paso b) al correspondiente aldehído de la fórmula (Ib):



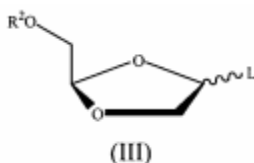
35 Donde  $R^2$  es benzoilo de p-metoxi;

40 d) Ciclizar el etanol esterificado de 2,2-dialcoxi de la fórmula (Ia) donde  $R^2$  es iso-butirilo o el aldehído de la fórmula (Ib) donde  $R^2$  es benzoilo de p-metoxi con ácido glicólico para obtener una lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II):



45 e) Resolver la lactona de 1,3-dioxolano de la fórmula (II) por medio de cromatografía quiral para obtener una D-lactona sustancialmente pura;

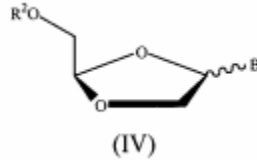
50 f) Reducir selectivamente con un agente reductor y activar a la lactona D-quiral pura para obtener un D-1,3-dioxolano sustancialmente puro de la fórmula (III):



55 Donde L es OAc;

- g) Acoplar el D-1,3-dioxolano sustancialmente puro de la fórmula (III) a un derivado activado de 2,6-dicloropurina para obtener una mezcla  $\alpha:\beta$  de los nucleósidos de D-1,3-dioxolano sustancialmente puros y protegidos de la fórmula (IV):

5



10

Donde B es una 2,6-dicloropurina;

- h) Purificar la mezcla  $\alpha:\beta$  de los nucleósidos de D-1,3-dioxolano sustancialmente puros y protegidos de la fórmula (IV) para obtener un dioxolano de  $\beta$ -D-2,6-dicloropurina sustancialmente puro y protegido;
- i) Convertir al sustituyente de 2,6-dicloropurina del nucleósido de  $\beta$ -D-2,6-dicloropurina sustancialmente puro y protegido del paso (h) a un sustituyente de 2,6-diaminopurina para dar un dioxolano sustancialmente puro y protegido de P-D-2,6-diaminopurina; y
- j) Desproteger el dioxolano sustancialmente puro protegido de  $\beta$ -D-2,6-diaminopurina del paso (i) para obtener el dioxolano sustancialmente puro de  $\beta$ -D-2,6-diaminopurina.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

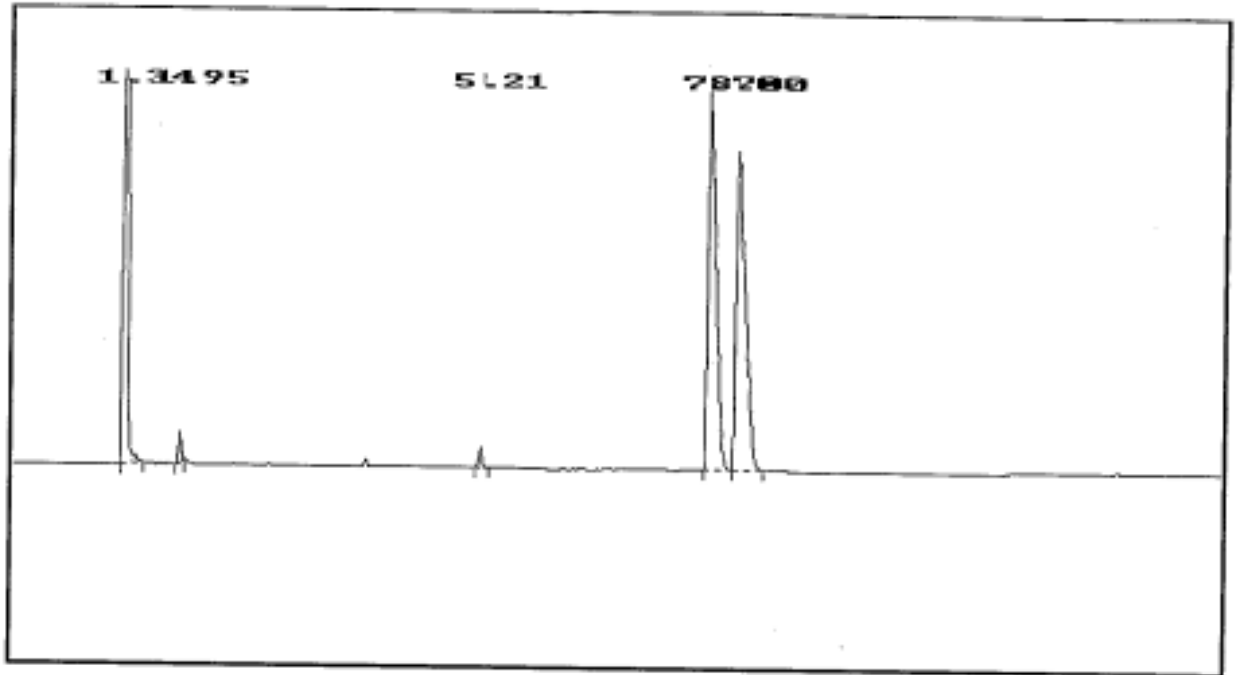


Figura 1A: Cromatograma típico del Compuesto 1

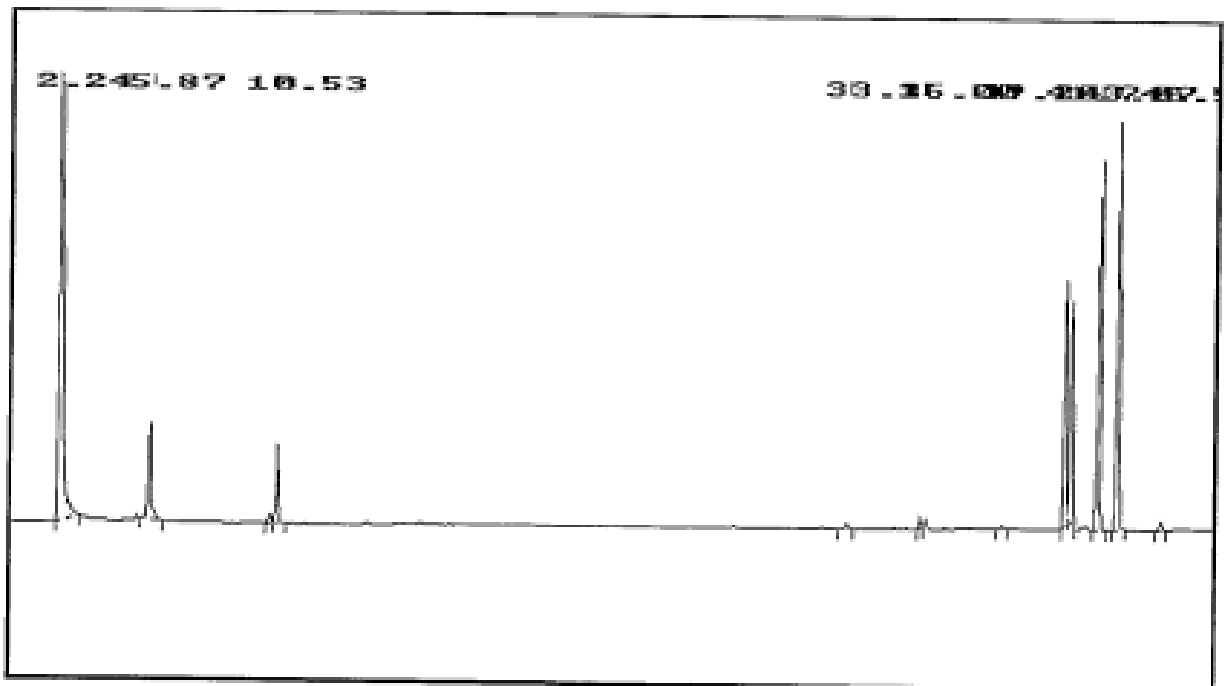


Figura 1B: Cromatograma típico del compuesto 3

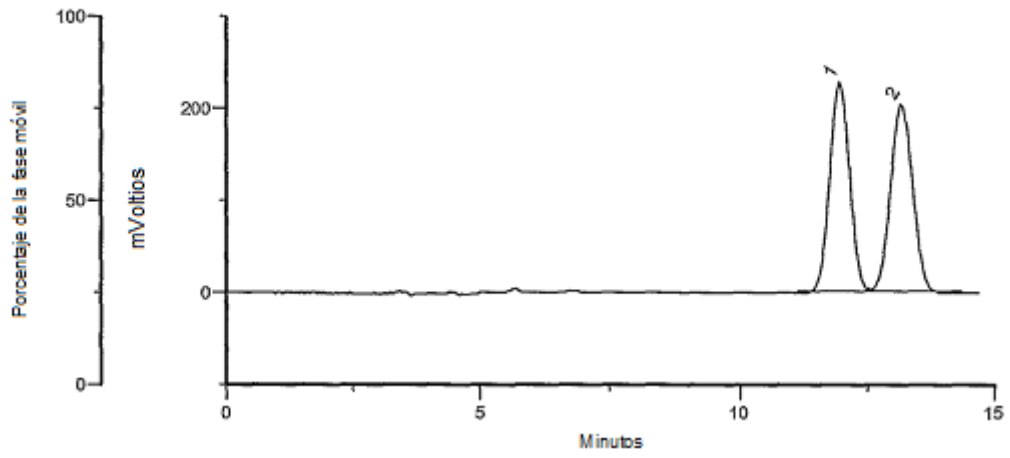


Figura 1C: Método HPLC, Compuesto 11

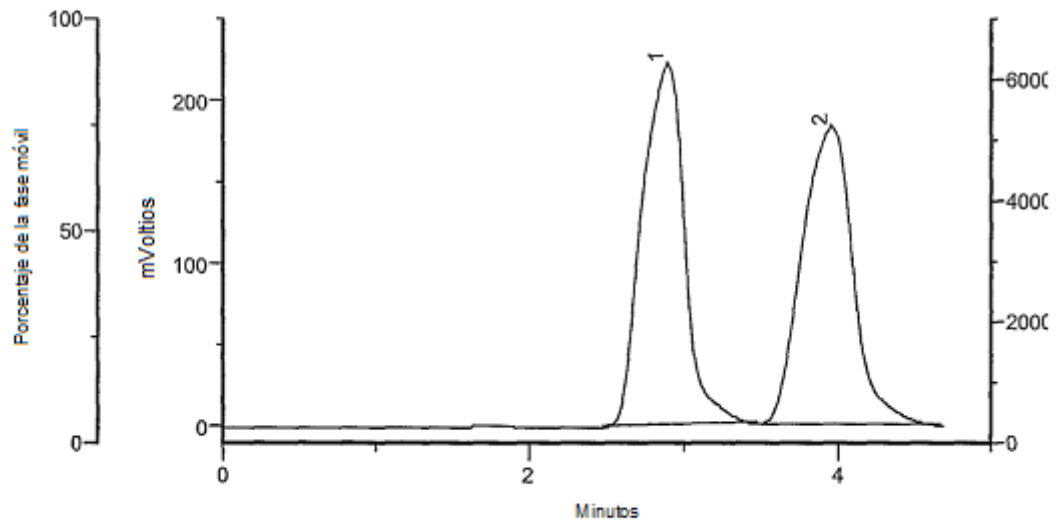


Figura 1D: Método SFC, compuesto 11

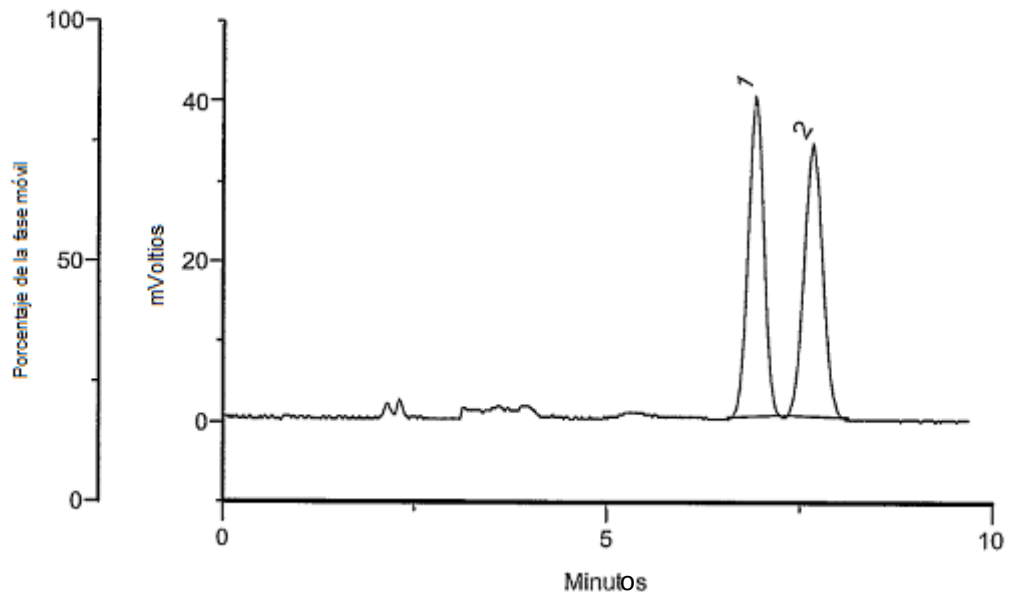


Figura 1E: Método HPLC, Compuesto 12

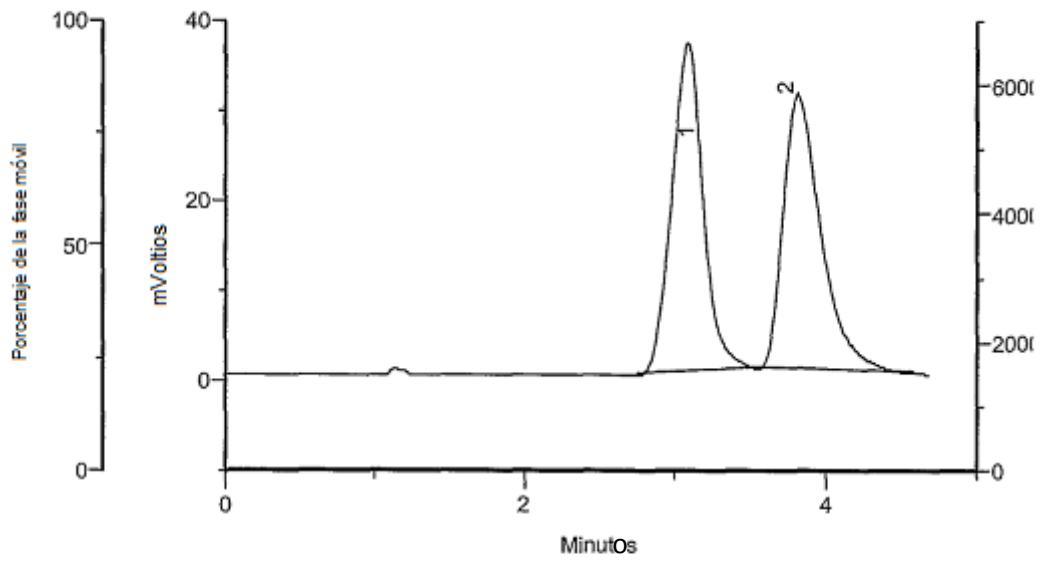


Figura 1F: Método SFC, Compuesto 12

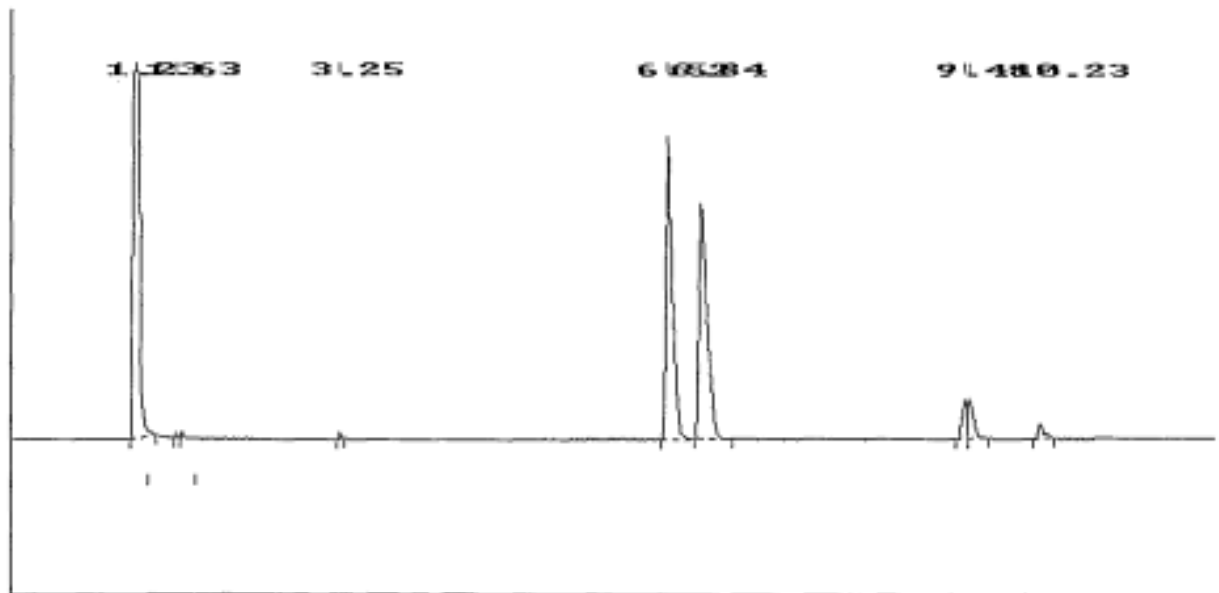


Figura 1G: Método GC quiral, Compuesto 13



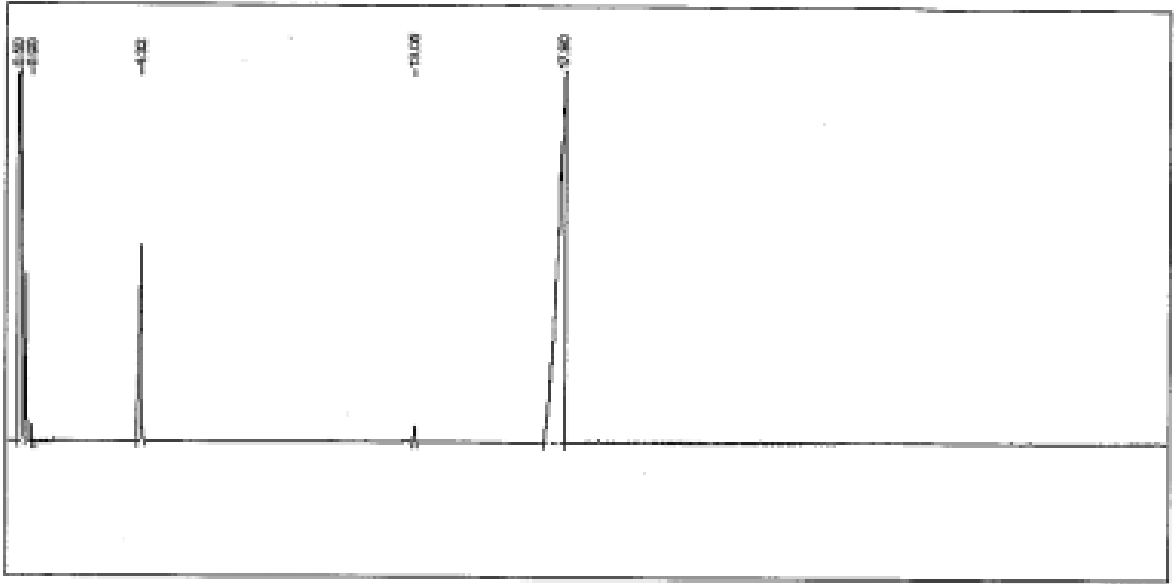


Figura 1H: Método de pureza GC, Compuesto 13

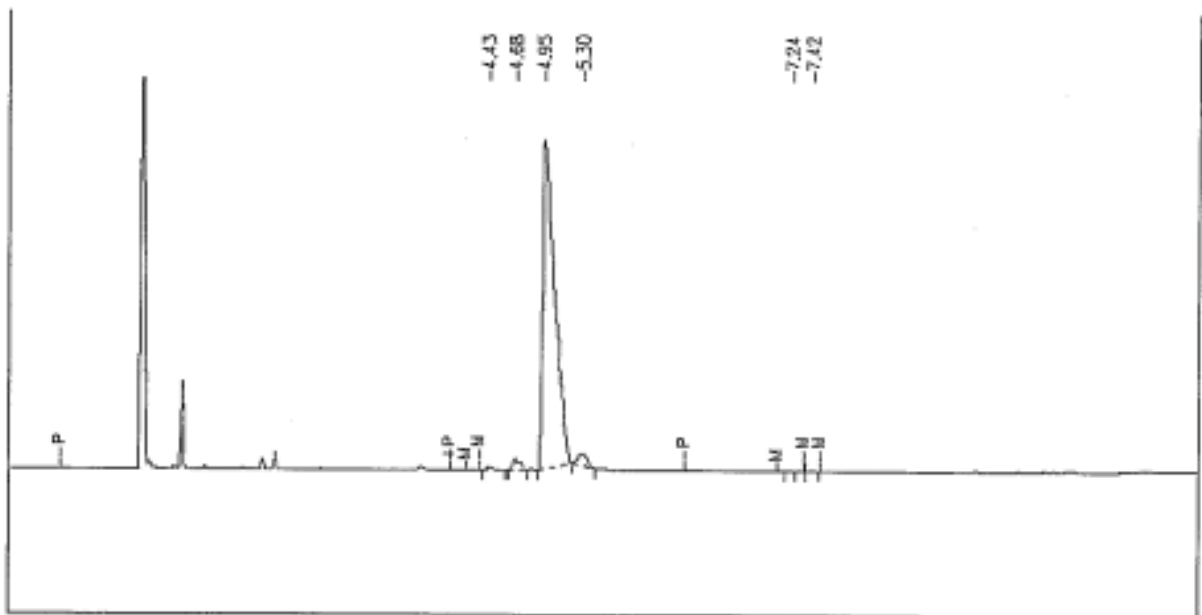


Figura 1I: Cromatograma GC quiral, Compuesto 13

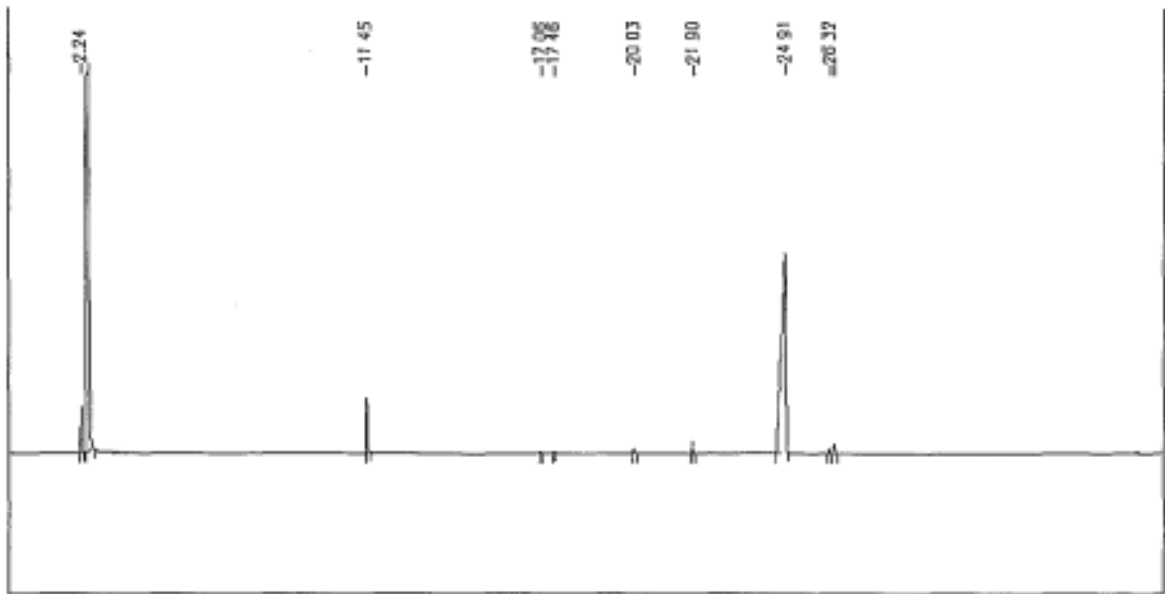


Figura 1J: Cromatograma GC aquiral, Compuesto 13

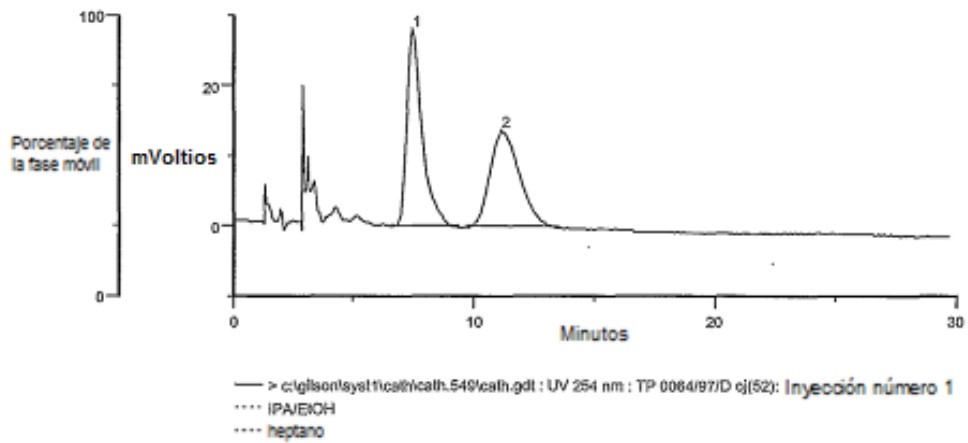


Figura 1K: Cromatograma típico del Compuesto 4

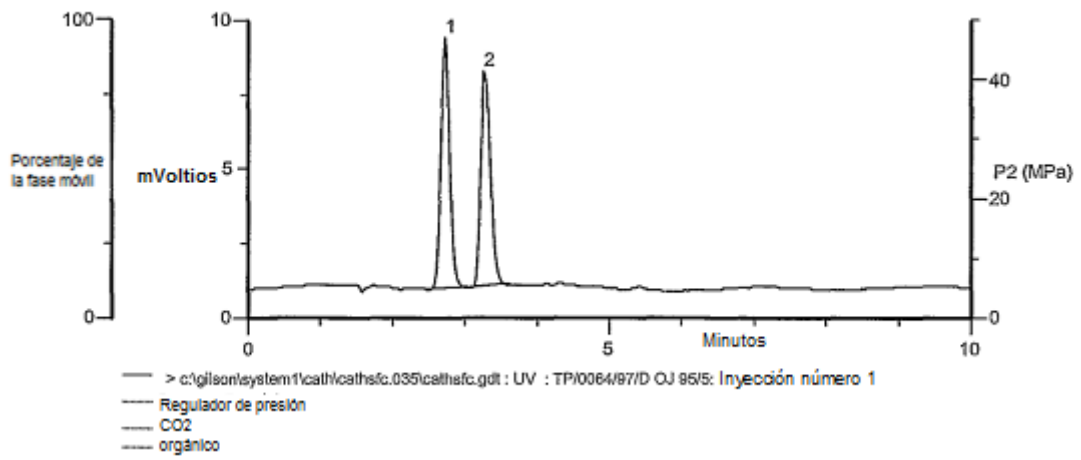


Figura 1L: Cromatograma de ensayo optimizado para el Compuesto 4

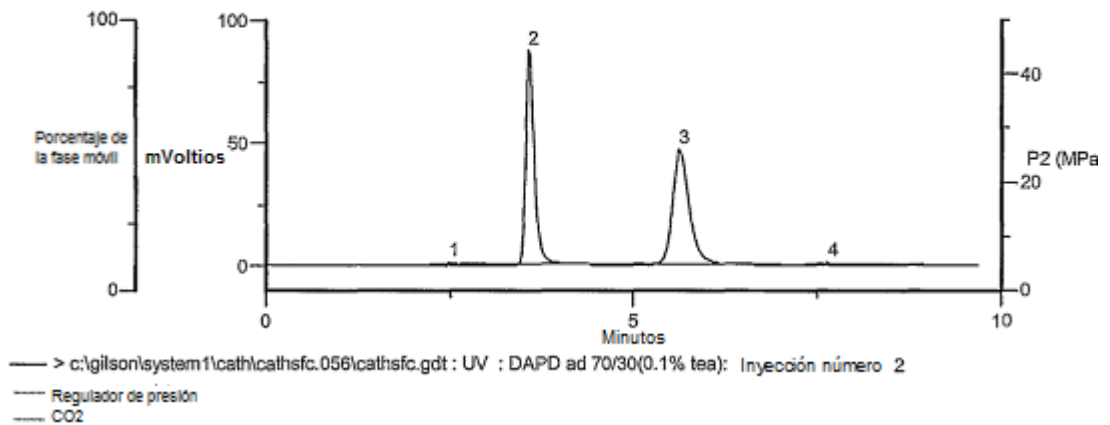
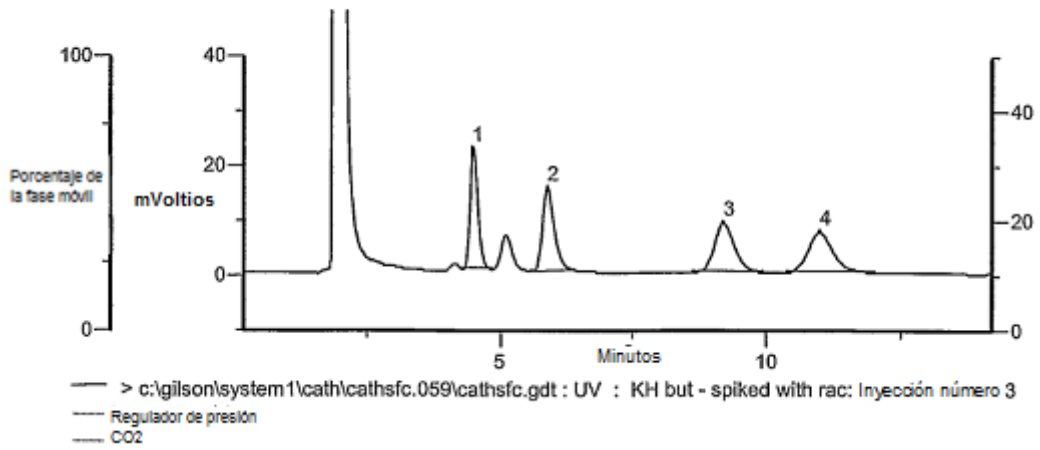
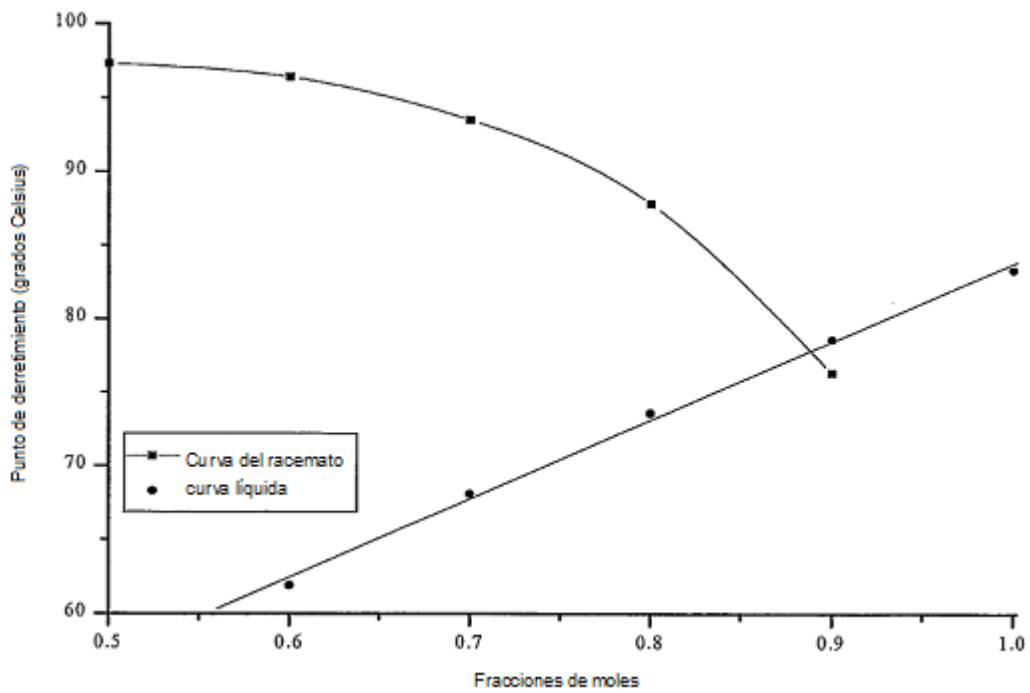


Figura 1M: Cromatograma típico para DAPD



Picos 1 y 3 - butirato de DAPD  
 Picos 2 y 4 - DAPD

**Figura 1N:** Cromatograma típico utilizando condiciones SFC para éster de DAPD y de butirato



**Figura 2:** Diagrama teórico de fase para el Compuesto 4



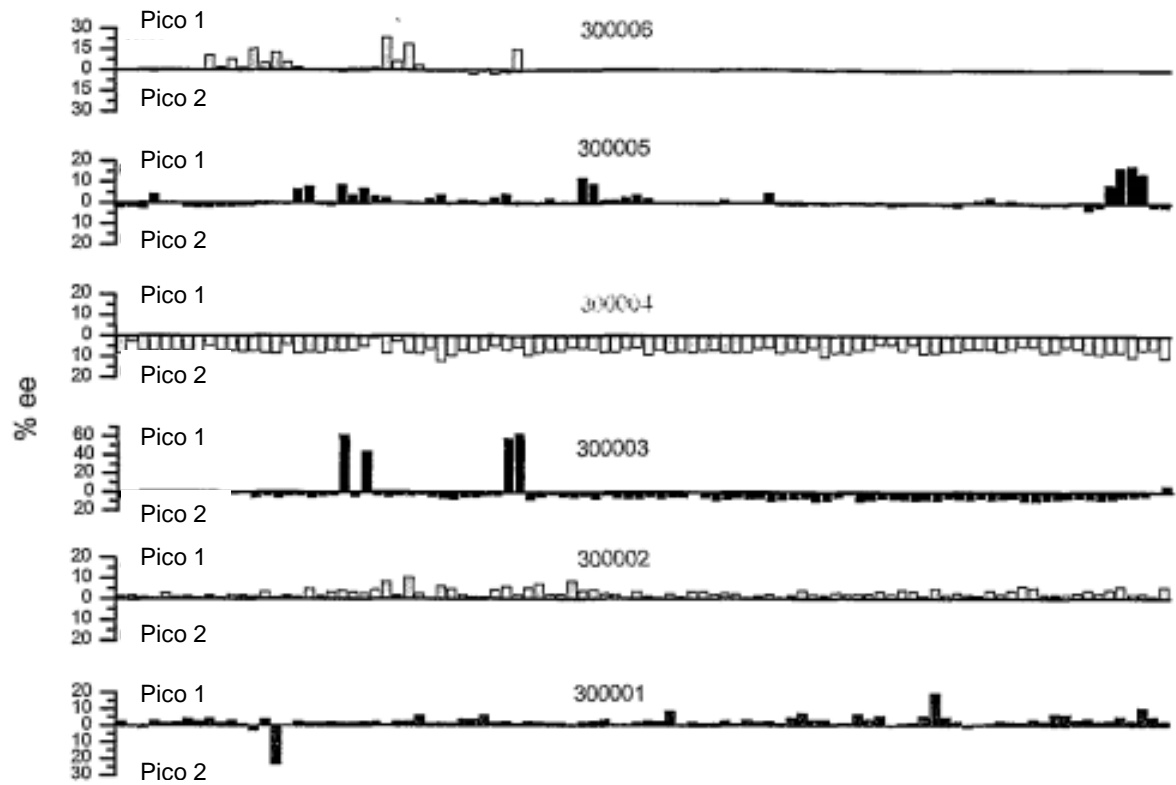


Figura 3C: Examinación microbiana del Compuesto 11

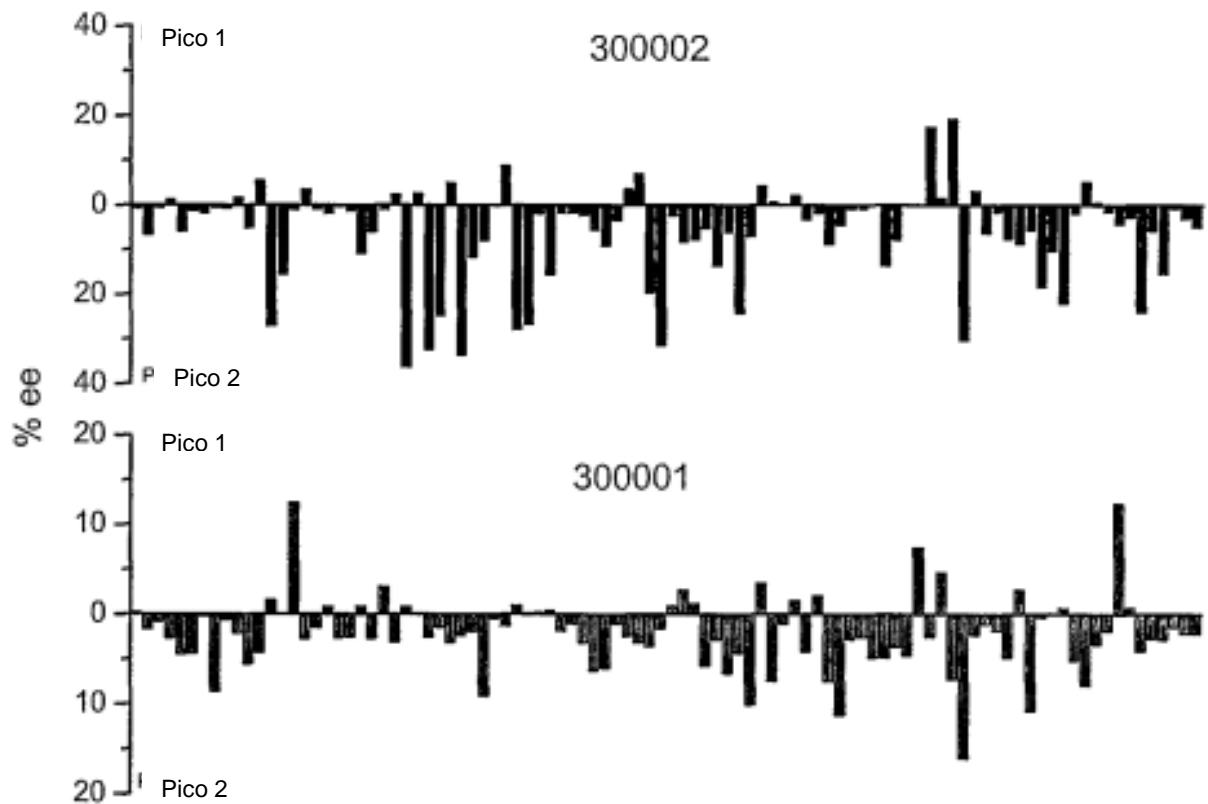


Figura 3D: Examinación microbiana del Compuesto 12

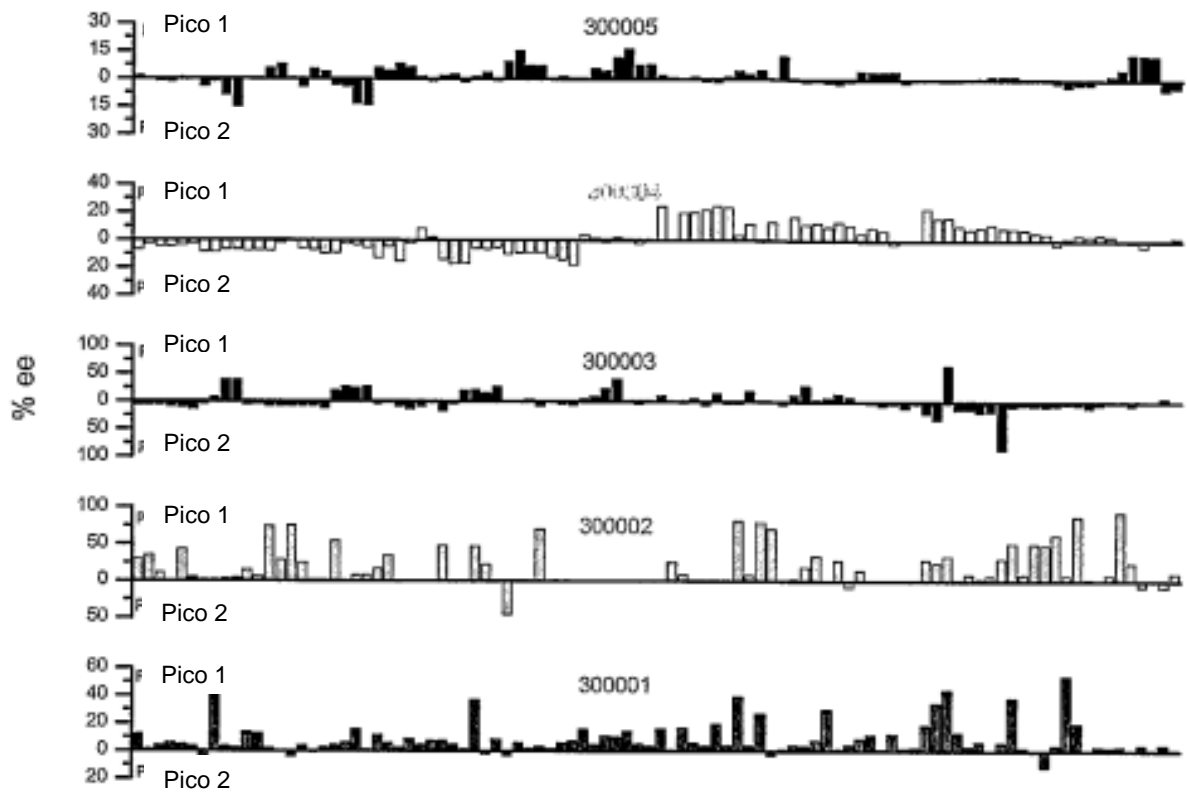


Figura 3E: Examinación microbiana del Compuesto 13

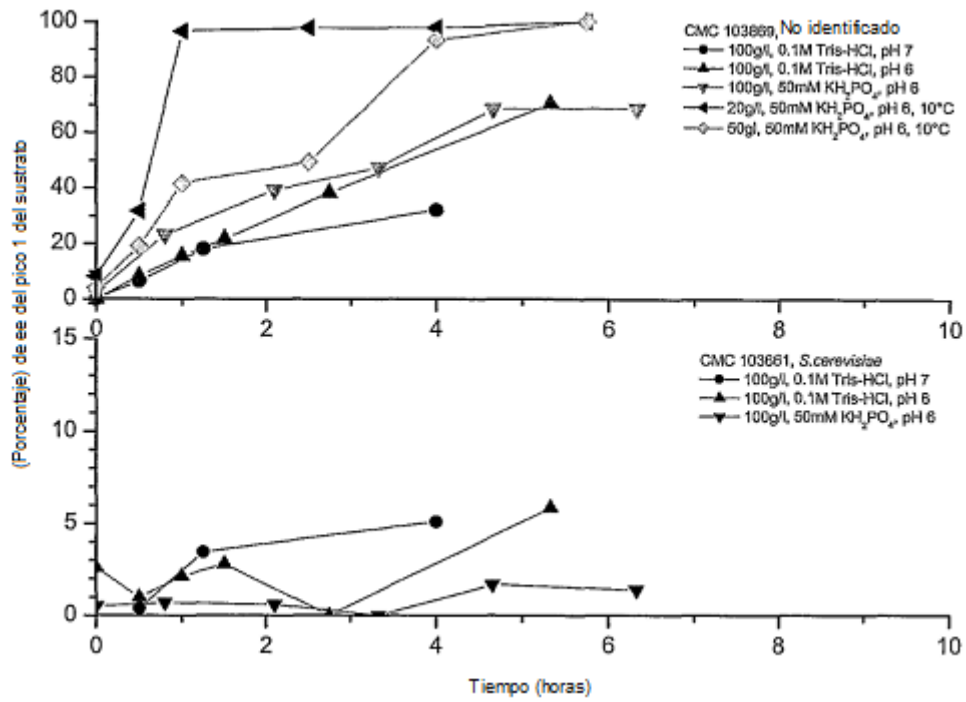


Figura 4: Resolución microbiana del Compuesto 13



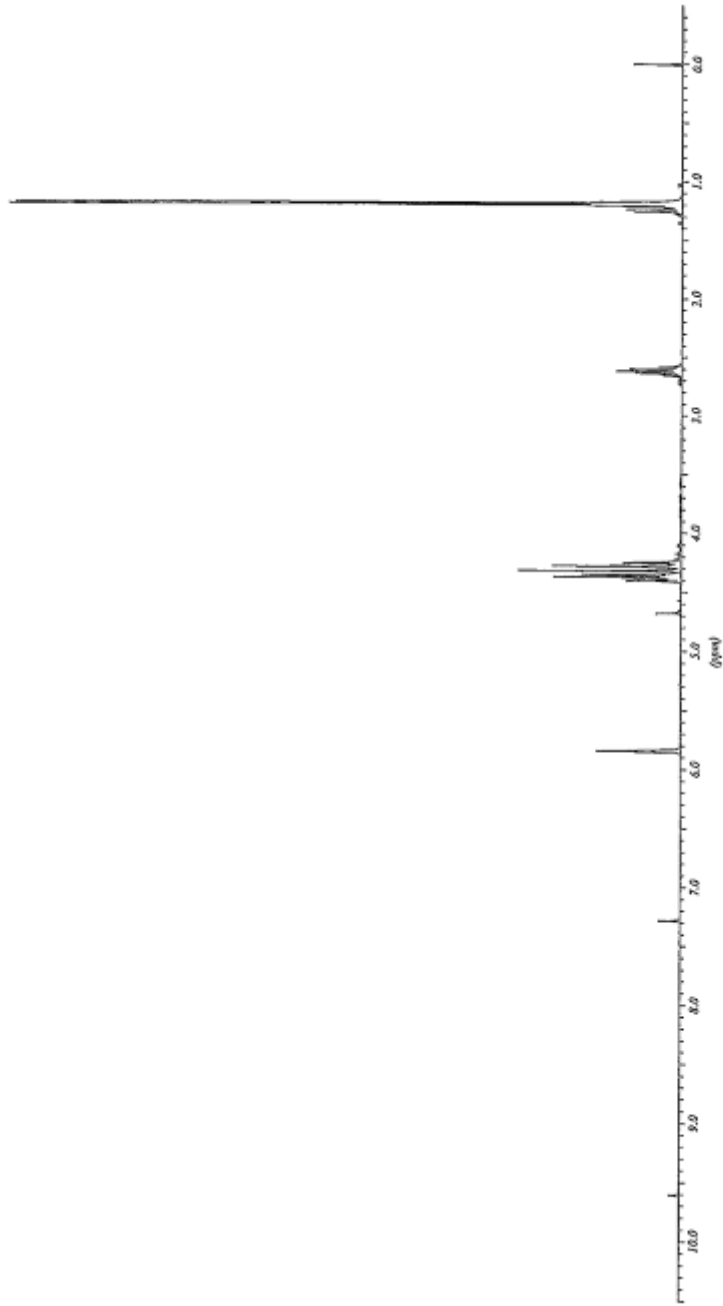


Figura 5: Espectro  $^1\text{H}$  NMR de 400 MHz para el resultado componente 13