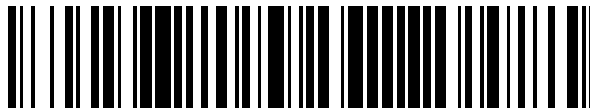


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 427**

51 Int. Cl.:

C07D 207/08 (2006.01)

C07D 207/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2012** **E 12842776 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2771006**

54 Título: **Proceso para la preparación de agonistas beta 3 y productos intermedios**

30 Prioridad:

27.10.2011 US 201161552200 P

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

27.09.2016

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**YASUDA, NOBUYOSHI;
LIU, ZHUQING;
ZHONG, YONG-LI;
CHUNG, JOHN, Y. L.;
DUNN, ROBERT, F.;
MALONEY, KEVIN, M.;
CAMPOS, KEVIN;
HOERRNER, R. SCOTT;
LYNCH, JOSEPH;
XU, FENG;
CLEATOR, EDWARD;
GIBSON, ANDREW;
KEEN, STEPHEN;
LIEBERMAN, DAVE y
YOSHIKAWA, NAOKI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 584 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de agonistas beta 3 y productos intermedios

5 **Campo de la invención**

La presente memoria se refiere a un proceso para la preparación de agonistas beta 3 y productos intermedios, biocatalizadores de cetorreductasa (KRED) y métodos de uso de los biocatalizadores.

10 **Referencia al listado de secuencias, tabla o programa informático**

La copia oficial del listado de secuencias se presenta simultáneamente con la memoria como un archivo de texto con formato ASCII a través del sistema EFS-Web, con un nombre de archivo MRL-BRE-00026-KRED.txt, una fecha de creación del 24 de octubre de 2011 y un tamaño de 9.617 bytes. El listado de secuencias presentado mediante el sistema EFS-Web es parte de la memoria y está incorporado en su totalidad por referencia en la presente memoria.

15 **Antecedentes de la invención**

Esta solicitud se refiere a un proceso de síntesis eficiente y económico para la preparación de un compuesto de fórmula I-11 que puede ser usado como un compuesto intermedio para la preparación de agonistas beta 3. Las rutas de síntesis para la pirrolidina sustituido de fórmula I-11 se han descrito en Bioorg and Med. Chem. Lett., 2011, 21, 1865, documentos US 2011/028481 y US 2009.253705. En estos procesos de la técnica anterior las pirrolidinas sustituidas se preparan por procesos que implican una reacción de metátesis cruzada de olefinas y la construcción del anillo de pirrolidina por una reacción de hidrogenación.

25

Sumario de la invención

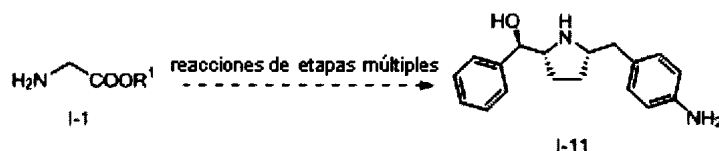
Esta solicitud se refiere a un proceso de síntesis multi-etapa para la preparación de un compuesto de fórmula I-11. En una realización, una enzima KRED se utiliza en el proceso multi-etapa.

30

Descripción de la invención

En la presente memoria se describe un proceso de preparación del compuesto I-11 a partir del compuesto I-1 a través de reacciones de etapas múltiples:

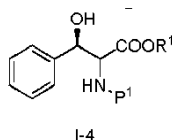
35



en la que R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, bencilo y fenilo.

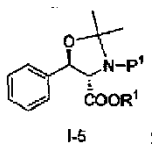
40 En una realización, las reacciones multi-etapa partiendo del compuesto I-1 hasta el compuesto I-11 comprenden las siguientes etapas:

(a) hacer reaccionar el compuesto I-4:



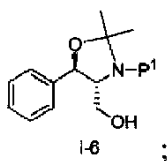
45

con un reactivo de protección acetónido seleccionado del grupo que consiste en 2,2-dimetoxipropano, 2,2-dietoxilpropano, 2-metoxipropeno y acetona, para producir el compuesto I-5:

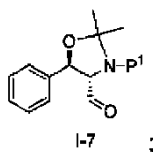


50

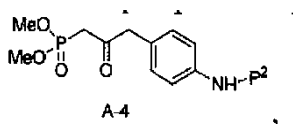
(b) reducir el compuesto I-5 con un agente reductor a una temperatura de 0 °C a 40 °C para producir el compuesto I-6:



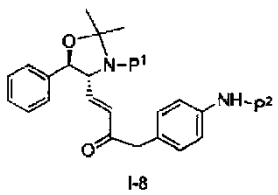
5
(c) oxidar el compuesto I-6 con un agente oxidante en presencia de un disolvente y un catalizador para producir el compuesto I-7:



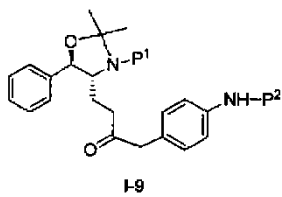
10
(d) hacer reaccionar el compuesto I-7 con el compuesto de fosfato A-4:



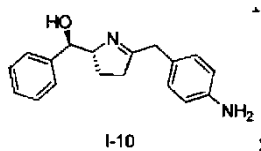
15 para producir el compuesto I-8:



20
(e) reducir el compuesto I-8 en presencia de un catalizador para producir el compuesto I-9:



(f) hacer reaccionar el compuesto I-9 con un ácido para producir el compuesto I-10:



25
y
30
(g) reducir el compuesto I-10 en presencia de un catalizador para producir el compuesto I-11;
en la que P¹ y P² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts; y
R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, bencilo y fenilo.

35
En una realización, el disolvente en la etapa (c) anterior se selecciona de entre el grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno y una mezcla que comprende dos de los disolventes anteriores. En otra realización, el agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en NaOCl, NaClO₂, peróxido de hidrógeno, trióxido de piridina-azufre, PCC y DCC. En otra realización, el catalizador es TEMPO o un análogo de TEMPO.

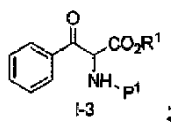
En una realización, la reacción entre I-7 y A-4 en la etapa (d) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 a 40 °C. En otra realización, la reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente seleccionado del grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno y una mezcla que comprende dos de los disolventes anteriores.

5 En una realización, el catalizador utilizado en la etapa de reducción (e) se selecciona del grupo que consiste en Pd, Ni Raney, Pt, PdCl₂ y Pd (OH)₂. En otra realización, la reducción se lleva a cabo en presencia de gas hidrógeno.

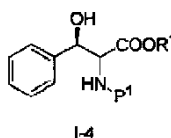
10 En una realización, el ácido en la etapa (f) se selecciona del grupo que consiste en HCl, HBr, TFA, MeSO₃H, TfOH, H₂SO₄, ácido para-toluenosulfónico y RSO₃H en la que R es alquilo, arilo o arilo sustituido.

15 En una realización, la reducción de la etapa (g) se lleva a cabo en presencia de HMDS. En otra realización, el catalizador utilizado se selecciona del grupo que consiste en Pt sobre alúmina, Pd sobre alúmina, Pd/C, Pd(OH)₂-C, Ni Raney, Rh/C, Rh/Al, Pt/C, Ru/C y PtO₂.

En una realización, las reacciones multi-etapa partiendo del compuesto I-1 hasta el compuesto I-11 comprenden, además, la reducción de compuesto I-3:



20 en presencia de una enzima KRED para producir el compuesto I-4:



25 En una realización, la enzima KRED se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de SEQ ID NO. 1 y un polipéptido de SEQ ID NO. 2.

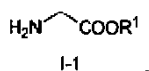
30 En otra realización, además de una enzima KRED también está presente un sistema de reciclado del cofactor. Sistemas de reciclado del cofactor adecuados incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido de SEQ ID NO. 3 y un polipéptido de SEQ ID NO. 4.

En una realización, están presentes una enzima KRED de SEQ ID NO. 1 y un sistema de reciclado del cofactor de SEQ ID NO. 3 en la reducción del compuesto I-3 a I-4.

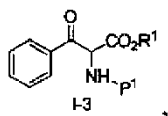
35 En otra realización, están presentes una enzima KRED de SEQ ID NO. 2 y un sistema de reciclado del cofactor de SEQ ID NO. 4 en la reducción del compuesto I-3 a I-4.

40 En una realización, además de una enzima KRED también está presente una molécula de cofactor que puede donar un electrón. En una realización, el cofactor se selecciona del grupo que consiste en NADH y NADPH.

En una realización, las reacciones multi-etapa partiendo del compuesto I-1 hasta el compuesto I-11 comprenden además hacer reaccionar el compuesto I-1:



45 con cloruro de benzoilo y un reactivo protector para producir el compuesto I-3:

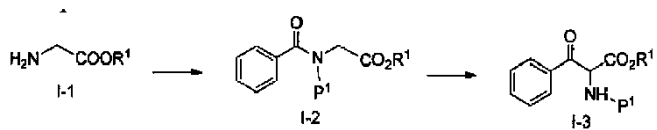


50 en la que P¹ es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Moz, y Ts y R¹ es alquilo C₁₋₆ o un arilo.

En una realización, R¹ es metilo, etilo, propilo o butilo. En otra realización, R¹ es metilo, etilo o fenilo. En una realización P¹ es Boc.

En una realización, la conversión del compuesto I-1 en el compuesto I-3 se lleva a cabo a través de compuesto I-2:

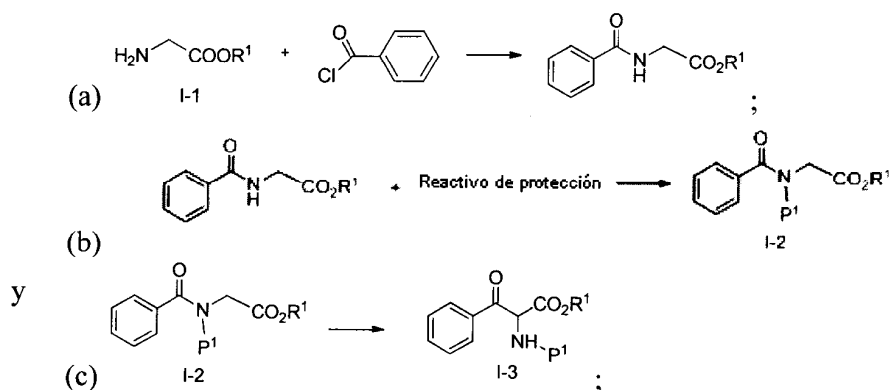
5



en la que R¹ es alquilo C₁₋₆ o un arilo y P¹ se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOC, Moz y Ts.

10

En una realización, la conversión de I-1 a I-3 comprende:



15 en la que R¹ es alquilo₁₋₆ o un arilo y P¹ se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOC, Moz y Ts. En una realización, R¹ es metilo o etilo y P¹ es Boc.

En una realización, la etapa (a) o (b) anterior se lleva a cabo en presencia de una base. Las bases adecuadas incluyen, pero no se limitan a NaOH, KOH, Na₂CO₃, K₂CO₃, NaHCO₃, K₃PO₄, Et₃N, i-Pr₂Net y piridina. En una realización, la base es NaHCO₃, Na₂CO₃ o Et₃N.

20

En una realización, el reactivo protector en la etapa (b) es Boc₂O.

En una realización, la conversión de I-1 a I-3 se lleva a cabo en presencia de un catalizador adecuado. En una realización, el catalizador es DMAP.

25

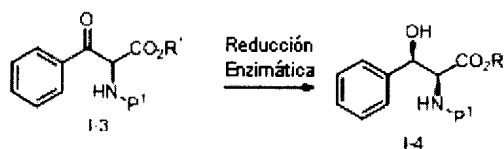
En una realización, la conversión de I-1 a I-3 se lleva a cabo a una temperatura de 0 °C a 60 °C o más específicamente, 0 °C a 40 °C, o incluso más específicamente, 20 °C a 30 °C. En una realización, la temperatura es de 20 °C a 30 °C.

30

En una realización, la conversión anterior de I-1 a I-3 se puede llevar a cabo utilizando procesos de síntesis similares al descrito en Novel N → C Acyl Migration Reaction of Acyclic Imides: A Facile Method for α-Aminoketones and β-Aminoalcohols, Hara, et. al., Tetrahedron Letter, Vol. 39, page 5537 (1998).

En una realización, la conversión del compuesto I-3 en el compuesto I-4 es a través de una reducción de resolución cinética dinámica (DKR) en presencia de una enzima KRED:

35



40 en la que R¹ es alquilo C₁₋₆ o un arilo y P¹ es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOC, Moz y Ts. En una realización, R¹ es metilo o etilo. En una realización, P¹ es Boc.

En una realización, la reducción enzimática de I-3 a I-4 se lleva a cabo en un disolvente. Disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, IPA, DMSO, DMF, DMAc y combinaciones de los mismos. En una realización, el disolvente es DMSO.

5 En una realización, la temperatura adecuada para la reducción DKR de I-3 a I-4 es de 0 °C - 60 °C, o más específicamente, de 10 °C - 40 °C o incluso más específicamente, de 20 °C - 35 °C. En una realización, la temperatura es de aproximadamente 30 °C.

10 En una realización, se usa una enzima KRED acoplada a un sistema de reciclado del cofactor y un cofactor NADPH para reducir el compuesto I-3 para obtener el compuesto I-4. Las condiciones de reacción adecuadas para la reducción catalizada por KRED de I-3 a I-4 se proporcionan a continuación y en los Ejemplos.

15 Las enzimas KRED pertenecientes a la clase EC 1.1.1.184 son útiles para la síntesis de alcoholes ópticamente activos a partir de los correspondientes sustratos cetónicos pro-estereoisoméricos y por la reducción estereoespecífica de los correspondientes sustratos aldehído y cetona racémicos.

20 Las enzimas KRED generalmente convierten un sustrato de cetona o aldehído en el correspondiente producto alcohol, pero también pueden catalizar la reacción inversa, la oxidación de un sustrato de alcohol en el correspondiente producto cetona/aldehído. La reducción de cetonas y aldehídos y la oxidación de alcoholes por enzimas tales como KRED requiere generalmente un cofactor, más comúnmente el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido (NADPH) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP +) para la reacción de oxidación. NADH y NADPH sirven como donantes de electrones, mientras que NAD y NADP sirven como aceptores de electrones. Las enzimas KRED a menudo pueden utilizar el cofactor fosforilado o no fosforilado.

25 Las enzimas KRED se pueden utilizar en lugar de los procedimientos químicos para la conversión de diferentes compuestos cetona y de aldehído en los productos alcohol quirales. Estas conversiones biocatalíticas pueden emplear células enteras que expresan la cetorreductasa para las reducciones de cetona biocatalíticas, o enzimas purificadas, en particular en los casos donde la presencia de múltiples cetorreductasas en células enteras afectaría negativamente a la pureza enantiomérica y al rendimiento del producto deseado. Para aplicaciones in vitro, se utiliza generalmente una enzima regeneradora del co-factor (NADH o NADPH) tal como la glucosa deshidrogenasa (GDH) y la formiato deshidrogenasa junto con la cetorreductasa.

30 Ejemplos que ilustran el uso de enzimas KRED de origen natural o manipuladas en procesos biocatalíticos para generar compuestos químicos útiles incluyen la reducción asimétrica de ésteres de 4-cloroacetato (Zhou, J. Am. Chem. Soc. 1983 105:5925-5926; Santaniello, J. Chem. Res. (S) 1984:132-133; patentes US-5.559.030; US-5.700.670 y US-5.891.685), la reducción de ácidos dioxocarboxílicos (por ejemplo, patente US-6.399.339), la reducción de (S)-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (por ejemplo, patente US-6.645.746 y el documento WO 01/40450), la reducción de compuestos a base de pirrolotriazina (por ejemplo, solicitud U.S. N.º 2006/0286646), la reducción de acetofenonas sustituidas (por ejemplo, patente US-6.800.477) y la reducción de cetotiolanos (documento WO 2005/054491).

35 Las enzimas KRED de origen natural se pueden encontrar en una amplia gama de bacterias y levaduras (para revisiones: Kraus and Waldman, Enzyme catalysis in organic synthesis Vols. 1&2.VCH Weinheim 1995; Faber, K., Biotransformations in organic chemistry, 4th Ed. Springer, Berlin Heidelberg New York. 2000; Hummel and Kula Eur. J. Biochem. 1989 184:1-13). Se han descrito varias secuencias de genes y enzimas KRED entre ellas: *Candida magnoliae* (N.º de Acceso GenBank JC7338; GI: 11360538); *Candida parapsilosis* (N.º de Acceso GenBank BAA24528.1; GI:2815409), *Sporobolomyces salmonicolor* (N.º de Acceso GenBank AF160799; GI:6539734); *Lactobacillus kefir* (N.º de Acceso GenBank AAP94029.1; GI: 33112056); *Lactobacillus brevis* (N.º de Acceso GenBank 1NXQ_A; GI: 30749782); *Exiguobacterium acetylicum* (N.º de Acceso GenBank BAD32703.1) y *Thermoanaerobium brockii* (N.º de Acceso GenBank P14941; GI: 1771790).

40 La reducción catalizada por KRED de I-3 a I-4 requiere que un donador de electrones esté presente en la solución. Generalmente, se utiliza un cofactor como el donante de electrones en la reacción de reducción KRED. El cofactor opera en combinación con KRED y/o GDH en el proceso. Cofactores adecuados incluyen, pero no se limitan a, NADP⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato), NADPH (la forma reducida de NADP⁺), NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina) y NADH (la forma reducida de NAD⁺). Generalmente, se añade la forma reducida del cofactor a la mezcla de reacción. En consecuencia, los métodos de la presente divulgación se llevan a cabo de forma que está presente un donador de electrones seleccionado del cofactor NADPH o NADH. En ciertas realizaciones, el método puede llevarse a cabo de forma que las condiciones de reacción comprenden una concentración de cofactor NADH o NADPH de aproximadamente 0,03-0,5 g/l, aproximadamente 0,05-0,3 g/l, aproximadamente 0,1-0,2 g/l, aproximadamente 0,5 g/l, aproximadamente 0,1 g/l o aproximadamente 0,2 g/l.

45 En algunas realizaciones del proceso, se utiliza un sistema de reciclado del cofactor para regenerar el cofactor NADPH/NADH a partir del NADP⁺/NAD⁺ producido en la reacción. Un sistema de reciclado del cofactor se refiere a un conjunto de reactantes que reducen la forma oxidada del cofactor (por ejemplo, NADP⁺ a NADPH) permitiendo de

este modo que prosiga la catálisis de KRED. El sistema de reciclado del cofactor puede comprender además un sustrato secundario y el catalizador, por ejemplo, el sustrato glucosa y la enzima GDH, que cataliza la reducción de la forma oxidada del cofactor por el reductor. Sistemas de reciclado del cofactor para regenerar NADH o NADPH a partir de NAD⁺ o NADP⁺, respectivamente, son conocidos en la técnica y se pueden usar en los métodos descritos en la presente memoria. Ejemplos de sistemas de reciclado del cofactor adecuados que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, glucosa y glucosa deshidrogenasa (GDH), formiato y formiato deshidrogenasa (FDH), glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, un alcohol secundario (por ejemplo, isopropanol) y alcohol secundario deshidrogenasa, fosfito y fosfito deshidrogenasa, hidrógeno molecular e hidrogenasa y similares. Estos sistemas se pueden usar en combinación con cualquiera NADP⁺/NADPH o NAD⁺/NADH como cofactor. También se puede utilizar la regeneración electroquímica usando hidrogenasa como un sistema de regeneración del cofactor. Véase, por ejemplo, las patentes US-5.538.867 y US-6.495.023, ambas dos incorporadas por referencia en la presente memoria. Los sistemas de regeneración del cofactor químicos que comprenden un catalizador de metal y un agente reductor (por ejemplo, hidrógeno molecular o formiato) son también adecuados. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 2000/053731, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

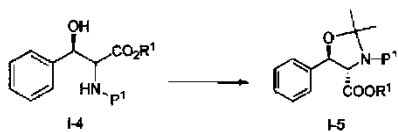
En algunas realizaciones de la presente divulgación, el sistema de reciclado del cofactor puede comprender glucosa deshidrogenasa (GDH), que es una enzima dependiente de NAD⁺ o NADP⁺ que cataliza la conversión de D-glucosa (dextrosa) y NAD⁺ o NADP⁺ en ácido glucónico y NADH o NADPH, respectivamente. Las enzimas GDH adecuadas para su uso en la práctica de los procesos descritos en la presente memoria incluyen tanto GDH de origen natural, como GDH de origen no natural. Los genes que codifican la glucosa deshidrogenasa de natural origen han sido descritos en la literatura, por ejemplo, el gen GDH 61297 de *Bacillus subtilis*, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. megaterium*. GDH no naturales generadas utilizando, por ejemplo, mutagénesis, evolución dirigida y similares se proporcionan en la publicación PCT WO 2005/018579 y en las publicaciones de los EE.UU. números 2005/0095619 y 2005/0153417.

En algunas realizaciones, el sistema de reciclado del cofactor puede comprender una formiato deshidrogenasa (FDH), que es una enzima dependiente de NAD⁺ o NADP⁺ que cataliza la conversión de formiato y NAD⁺ o NADP⁺ en dióxido de carbono y NADH o NADPH, respectivamente. Las FDH adecuadas para su uso como sistemas de regeneración del cofactor en la reacción catalizada por KRED descritas en la presente memoria incluyen las formiato deshidrogenasas de origen natural y no natural. Formiato deshidrogenasas adecuadas se describen en la publicación PCT WO 2005/018579. El formiato se puede proporcionar en forma de una sal, generalmente, una sal alcalina o de amonio (por ejemplo, HCO₂Na, KHCO₂NH₄ y similares), en forma de ácido fórmico, ácido fórmico generalmente acuoso o mezclas de los mismos. Se puede usar una base o tampón para proporcionar el pH deseado.

En algunas realizaciones, el sistema de regeneración del cofactor puede comprender la misma enzima KRED que cataliza la reducción de I-3 a I-4. En tal realización, la misma KRED que cataliza la reducción de I-3 a I-4 también cataliza la oxidación de un alcohol secundario (por ejemplo, la oxidación de isopropanol en acetona) y, por lo tanto, al mismo tiempo reduce el NAD⁺ o NADP⁺ en NADH o NADPH. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la conversión catalizada por KRED de I-3 en I-4, puede llevarse a cabo en presencia de un alcohol secundario (por ejemplo, IPA) y sin ningún tipo de coenzima (por ejemplo, GDH) presente en la solución para el reciclado del cofactor NADPH o NADH. En tales realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una concentración de IPA que es de aproximadamente 55-75 % (v/v), una carga de cofactor NADPH o NADH de aproximadamente 0,03-0,5 g/l y en el que no está presente ninguna enzima de reciclado del cofactor aparte de la propia KRED.

Sistemas de reciclado del cofactor adecuados para su uso en la conversión catalizada por KRED del compuesto I-3 en I-4 incluyen la coenzima glucosa deshidrogenasa acoplada con el sustrato glucosa (L-glucosa o D-glucosa). Cofactores de GDH adecuados incluyen, pero no se limitan a, la GDH de polipéptidos con la SEQ ID NO. 3 y la GDH de polipéptidos con la SEQ ID NO. 4, las cuales están disponibles comercialmente en Codexis Inc., Redwood City, California.

En una realización, el compuesto I-5 se prepara por reacción del compuesto I-4 con un agente de protección de acetónido:



en la que R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, bencilo y fenilo y P¹ se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts. En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo y bencilo. En otra realización, P¹ es Boc.

Reactivos de protección acetónido adecuados incluyen, pero no se limitan a, 2,2-dimetoxipropano, 2,2-dietoxilpropano, 2-metoxipropano y acetona. En una realización, el reactivo de protección de acetónido es 2,2-dimetoxipropano.

5 La reacción de I-4 a I-5 se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, tolueno, acetona, THF, IPAc, diclorometano, EtOAc, MeCN y mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente es una mezcla de tolueno y acetona.

10 La reacción de I-4 a I-5 se puede llevar a cabo en presencia de un ácido. Los ácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, trihaluros de boro, organoboranos, HCl, H₂SO₄, TFA, H₃PO₄ y TiCl₄. En una realización, el ácido es BF₃. En otra realización, el BF₃ está en la forma de eterato de trifluoruro de boro (BF₃·O(Et)₂).

15 La reacción de I-4 a I-5 puede llevarse a cabo a una temperatura de 10 °C a 50 °C, o más específicamente, 20 °C a 40 °C. Se ha encontrado que el aumento de la temperatura de reacción de 20 °C a 40 °C puede aumentar la velocidad de reacción en 2-3 veces mientras que no afecta al perfil del producto.

En una realización, el compuesto I-6 se prepara a partir del compuesto I-5 con un agente reductor:



20 en la que R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, bencilo y fenilo y P¹ se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOC, Ns, Moz y Ts. En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo y bencilo. En otra realización, P¹ es Boc.

25 Los agentes reductores adecuados incluyen, pero no se limitan a LiAlH₄, LiBH₄, NaBH₄-LiBr y DIBAL. En una realización, el agente reductor es LiAlH₄. En otra realización, el agente reductor es LiBH₄. En otra realización más, el agente reductor LiBH₄ se puede generar in situ, por ejemplo, mediante el uso de una combinación de NaBH₄ y LiBr.

30 La cantidad del agente reductor es generalmente de 0,8 a 1,6 equiv., o más específicamente, de 1,0 a 1,4 equiv.

En una realización, la reducción de I-5 a I-6 se lleva a cabo a una temperatura de 0 °C a 60 °C, o más específicamente, de 0 °C a 35 °C, o incluso más específicamente, de 20 °C a 30 °C. En una realización, la temperatura es de 20 °C a 30 °C.

35 En una realización, la oxidación del compuesto I-6 en el Compuesto I-7 se lleva a cabo en presencia de un catalizador con un agente oxidante:



40 en la que P¹ se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOC, Ns, Moz y Ts. En una realización, P¹ es Boc.

45 Los agentes oxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, NaOCl, NaClO₂, peróxido de hidrógeno, la oxidación de Swern y variantes tales como trióxido de azufre-piridina, PCC y DCC. En una realización, el agente oxidante es NaOCl.

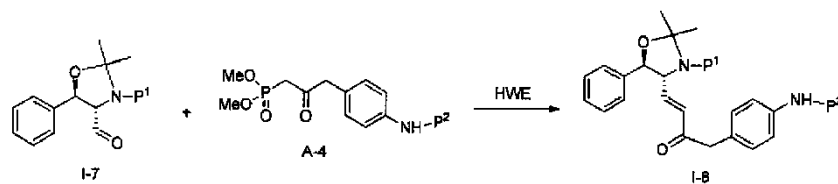
La cantidad del agente oxidante es generalmente 1,1 equiv. a 1,3 equiv., o más específicamente, 1,2 equiv. a 1,25 equiv. En una realización, la cantidad del agente oxidante es 1,25 equiv.

50 Los catalizadores adecuados para la reacción de oxidación anterior incluyen, pero no se limitan a, TEMPO y análogos de TEMPO. En una realización, el catalizador es TEMPO.

Una ventaja del proceso descrito actualmente es que el compuesto I-7 de la etapa de oxidación se puede utilizar directamente en la siguiente etapa de Horner Wadsworth Emmons (en lo sucesivo, "HWE") para obtener el compuesto I-8. Este proceso sin pasos intermedios elimina la necesidad de cambio de disolvente y puede aumentar el rendimiento y reducir el coste.

5 En una realización, la etapa de oxidación de I-6 a I-7 se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno y mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente es una mezcla de tolueno y MeCN. En otra realización, el disolvente es una mezcla de CH₂Cl₂ y MeCN.

10 En una realización, la reacción de HWE entre I-7 y A-4 se lleva a cabo en presencia de un disolvente:



15 en la que P¹ y P² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts. En una realización, P¹ y P² son Boc.

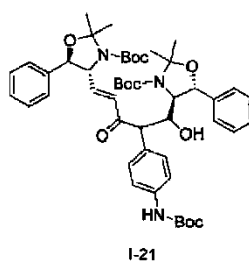
20 Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno y una mezcla que comprende dos de los disolventes anteriores. En una realización, el disolvente es una mezcla de tolueno y MeCN.

La reacción HWE se lleva a cabo generalmente a una temperatura de -10 a 50 °C, o más específicamente, de 0 a 40 °C. En una realización, la temperatura es de 0 a 25 °C. En otra realización, la temperatura es 40 °C.

25 La reacción HWE se lleva a cabo generalmente en presencia de una base o una sal. En una realización, la base es una amina terciaria. En otra realización, la base es *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA).

En una realización, la sal es haluro de litio, o más específicamente, LiCl o LiBr.

30 En la reacción de HWE, puede formarse un compuesto impureza I-21 (subproducto dímero de aldol) además del compuesto I-8:



35 Se ha encontrado que ajustando el pH a entre 6,5 y 7,0 después de la reacción, se puede obtener un compuesto I-8 de mayor pureza con rendimiento mejorado. Además, se ha demostrado que la adición del compuesto más reactivo A-4 conduce a la impureza I-21 a dar el producto I-8. En una realización, la adición de 0,2 equiv extra de A-4 puede reducir el nivel de I-21 a partir de 8 LCAP a 2 LCAP.

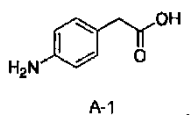
40 El aumento de la temperatura de reacción puede acelerar la conversión en el compuesto del producto deseado I-8 y reducir el nivel del compuesto subproducto I-21.

45 Si se cambia la reacción de un proceso por lotes a un proceso de adición controlado, el rendimiento del compuesto I-8 puede mejorarse y el nivel de compuesto subproducto I-21 se puede reducir. Por ejemplo, mediante la adición de compuesto reactivo I-7 a una solución que contiene el compuesto reactivo A-4, el nivel de I-21 puede disminuir y el rendimiento del compuesto I-8 mejorar.

50 En una realización, se preparó una solución que contiene 1,2 equiv de A-4, 3 equiv. de DIPEA y 3 equiv. de LiCl en 5 volúmenes de MeCN y se calentó a 40 °C. A continuación se añadió una corriente de tolueno del compuesto I-7 a esta mezcla durante 3 h, después de un período de reposo adicional de 30 min, se completó la conversión en el producto. El nivel de impureza I-21 era de aproximadamente ~ 1 LCAP. El muestreo de la reacción a intervalos de 1 h mostró que no había acumulación de compuesto I-7 en la mezcla de reacción. Después del procesamiento, el producto se aisló con un rendimiento del 90 %.

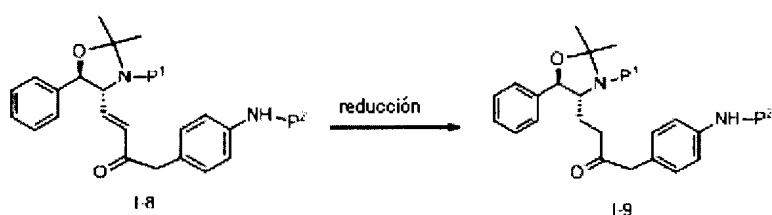
También se ha encontrado que el uso de una cantidad ligeramente menor de A-4 reactivo no afecta negativamente al rendimiento del compuesto I-8. En una realización, se utilizó 1,0 en lugar de 1,2 equiv. del compuesto A-4 y todavía se obtuvo un alto rendimiento.

- 5 El compuesto A-4 utilizado en la reacción de HWE se puede preparar a partir del compuesto A-1:



- 10 usando etapas de síntesis similares y condiciones que se describen en A General Procedure for the Preparation of β -Ketophosphonates, Maloney et. al., J. Org. Chem., 74, página 7574 a 7.576 (2009).

En una realización, la reducción del compuesto I-8 para producir el compuesto I-9 se lleva a cabo en presencia de un catalizador:



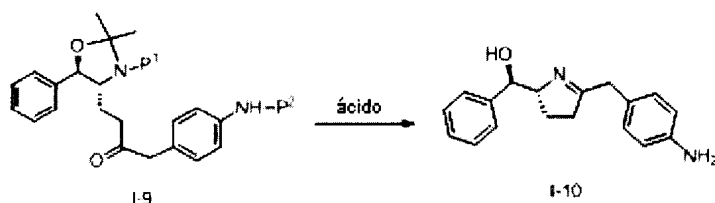
- 15 en la que P¹ y P² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOC, Ns, Moz y Ts. En una realización, tanto P¹ como P² son Boc.

- 20 Los catalizadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, Pd, Ni Raney, Pt, PdCl₂ y Pd(OH)₂. En una realización, el catalizador es Pd/C 5 %.

- 25 En otra realización, la reducción de la I-8 a I-9 se lleva a cabo en presencia de un disolvente. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno, metanol, etanol, 2-propanol y mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente es THF.

En otra realización, la reacción de reducción se lleva a cabo usando gas hidrógeno a una presión de 2 a 300 psig, preferiblemente de aproximadamente 40 psig, en presencia de un catalizador.

- 30 En una realización, el compuesto I-9 reacciona con un ácido para producir el compuesto I-10 a través de una reacción de ciclación:

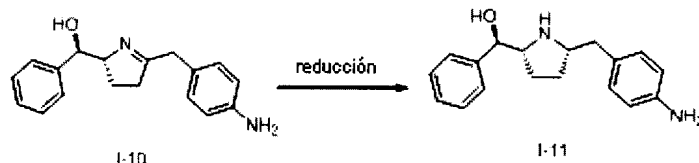


- 35 Los ácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, HCl, HBr, TFA, MeSO₃H, TfOH, H₂SO₄, ácido para-toluenosulfónico y otros ácidos de sulfona tales como RSO₃H en la que R es alquilo C₁₋₆, arilo o arilo sustituido. En una realización, el ácido es HCl.

- 40 En una realización, se usa HCl como ácido y se obtiene una sal HCl del compuesto I-10. En una realización, la sal HCl se encuentra en forma de sal bis-HCl. En otra realización, la sal bis-HCl está en la forma de un mono-hidrato. En otra realización, el mono-hidrato de la sal bis-HCl del compuesto I-10 es un material cristalino.

- 45 La conversión I-9 a I-10 se puede llevar a cabo a una temperatura de 0 a 40 °C, o más específicamente, de 15 a 25 °C, o incluso más específicamente, de 20 a 25 °C. En una realización, la temperatura es de 20 a 25 °C.

En una realización, el compuesto I-10 se reduce para dar el compuesto I-11 en presencia de un catalizador:



Las condiciones de reacción para la conversión de I-10 a I-11 pueden ser controladas de manera que se obtiene un proceso de hidrogenación *cis*-selectiva. En una realización, la hidrogenación *cis*-selectiva se lleva a cabo en presencia de un catalizador. Los catalizadores adecuados incluyen, pero no se limitan a Pt sobre alúmina, Pd sobre alúmina, Pd/C, Pd(OH)₂-C, Ni Raney, Rh/C, Rh/Al, Pt/C, Ru/C y PtO₂. En una realización, el catalizador es Pt sobre alúmina.

En otra realización, la hidrogenación *cis*-selectiva de I-10 a I-11 se lleva a cabo en presencia de HMDS, que puede proteger el grupo hidroxilo *in situ* y por lo tanto mejorar la selectividad diastereo. Otros reactivos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, TMSCl, TESC1 y TBDMSC1.

En una realización, se obtiene el compuesto I-11 en forma de una base libre anhidra cristalina. En otra realización, se obtiene el compuesto I-11 en forma de un hemihidrato de base libre cristalina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo" significa grupos hidrocarbonados alifáticos saturados tanto de cadena ramificada como lineal que tienen el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ incluye, pero no se limita a, metilo (Me), etilo (Et), *n*-propilo (Pr), *n*-butilo (Bu), *n*-pentilo, *n*-hexilo y los isómeros de los mismos tales como isopropilo (*i*-Pr), isobutilo (*i*-Bu), secbutilo (*s*-Bu), *terc*-butilo (*t*-Bu), isopentilo, sec-pentilo, *terc*-pentilo e isohexilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un carbociclo aromático. Por ejemplo, arilo incluye, pero no se limita a, fenilo y naftaleno.

A lo largo de la solicitud, los siguientes términos tienen los significados indicados a menos que se indique lo contrario:

Término	Significado
Ac	Acilo (CH ₃ CO)-
Aq	Acuoso
Bn	Bencilo
BOC (Boc)	<i>t</i> -butiloxicarbonilo
Boc ₂ O	Dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
Bz	Benzoílo
°C	Grados Celsius
Calc.	Calculado
Cbz	Carbobenciloxi
CDI	1,1'-Carbonildiimidazol
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DKR	Resolución cinética dinámica
DMAc	N,N-dimetilacetamida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMPM	3,4-Dimetoxibencilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	1Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
Eq. o equiv.	Equivalente(s)
ES-MS y ESI-MS	Espectrometría de masas y Espectrometría de masas con Ionización por electronebulización
Et	Etilo
EtOAc	Acetato de etilo
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

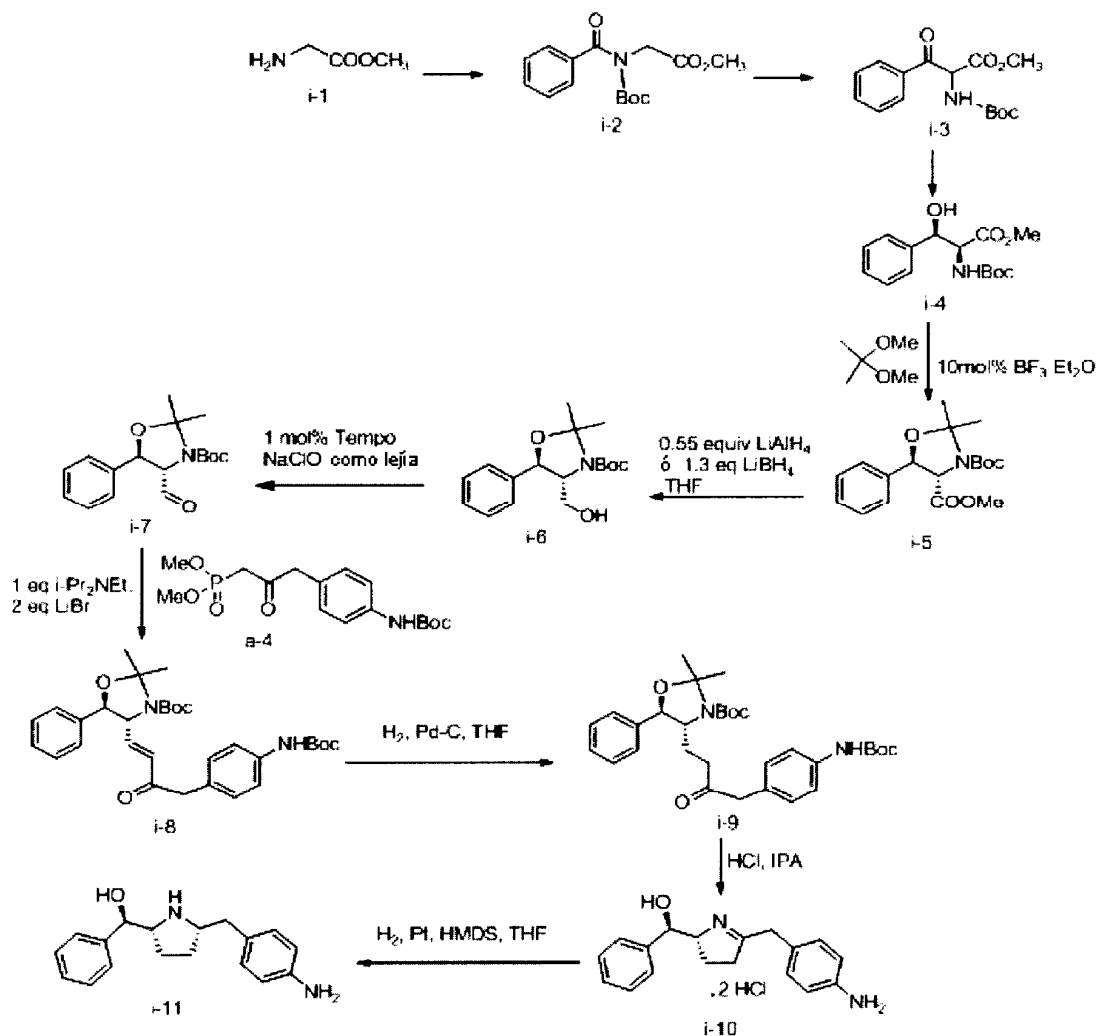
HCl	Cloruro de hidrogeno
HMDS	Hexametildisilazano
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HOAc	Ácido acético
HOBT	1-Hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOPO	2-Hidroxipiridin- <i>N</i> -óxido
IPA	Alcohol isopropílico
kg	Kilogramo(s)
LC/MS o LC-MASS	Cromatografía líquida-espectro de masas
l	Litro(s)
LAH o LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
LCAP	Porcentaje del área de la cromatografía líquida
LiBH ₄	Borohidruro de litio
M	Molar
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
min	Minuto(s)
mg	Miligramo(s)
ml	Mililitro(s)
mmol	Milimol(s)
Moz o MeOZ	<i>p</i> -metoxibencil carbonilo
MTBE	Metil terc-butil éter
NADP	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, sal sódica
nM	Nanomolar
Ns	4-nitrobencono sulfonilo
PCC	Clorocromiato de piridinio
Pd/C 5 %	Paladio sobre carbón activado al 5 por ciento en peso
Ph	Fenilo
TA	Temperatura ambiente
Sat.	Saturado
TBDMSCI	Cloruro de <i>terc</i> -butildimetilsililo
TEA o Et ₃ N	Trietilamina
TEMPO	1-Oxil-2,2,6,6-Tetrametilpiperidina
TESCI	Trietilclorosilano
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMSCI	Trimetilclorosilano
Ts	<i>p</i> -tolueno sulfonilo

Los siguientes esquemas de reacción ilustran las etapas de síntesis, los reactivos y condiciones empleadas en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria. La síntesis del compuesto I-11, que es el objetivo de esta invención puede llevarse a cabo por una o más de rutas similares.

EJEMPLO 1

Preparación del compuesto i-11 a partir del compuesto de partida i-1

Esquema 1



5

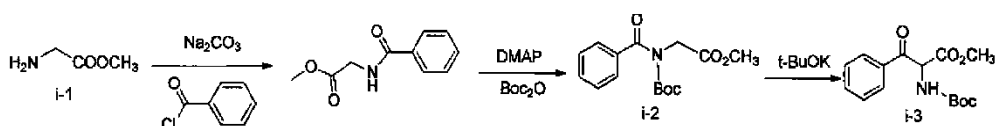
En el Esquema 1, un proceso sin pasos intermedios produjo ceto amida i-3 a partir de material de partida i-1. Una reducción DKR enzimática produjo i-4 a partir de i-3. Después de la protección, el éster i-5 fue reducido al alcohol i-6 con LAH o LiBH₄.

10

Una vez obtenido el compuesto i-6, este se convirtió en i-7 por oxidación con TEMPO. Para la oxidación con TEMPO y la posterior etapa de acoplamiento HWE, se utilizó un proceso sin pasos intermedios, de tal manera que la corriente en bruto del aldehído i-7 después del corte de fase se utilizó directamente para la reacción HWE para evitar el cambio de disolvente. La cetona i-8 insaturada se aisló en 5 etapas. Por último, el compuesto i-8 se convirtió en el compuesto i-11 a través de i-9 e i-10. A continuación se describen las condiciones experimentales detalladas.

15

Etapa 1. Preparación del compuesto i-3 a partir del compuesto i-1



20

A una mezcla de Na₂CO₃ (110 g, 1,034 mol) en agua (606 ml) y EtOAc (606 ml) a 0-5 °C se añadió éster metílico de glicina (i-1, 119 g, 948 mmol) en porciones durante 30 min. La suspensión resultante se dejó reposar durante 15 a

30 min adicionales, se añadió a continuación PhCOCl (100 ml, 0,862 mol) gota a gota durante 1,5 h a 0-5 °C. Después del reposo adicional 1 h a 0-5 °C, la mezcla de reacción se calentó a 25 °C para formar una solución bifásica homogénea. La fase orgánica separada se concentró azeotrópicamente y el disolvente se cambió a MeCN. Se obtuvo un volumen final de aproximadamente 600 ml.

5 A continuación se añadió DMAP (43,1 mmol, 5,26 g) y después una solución de Boc₂O (0,948 mol, 207 g) en MeCN (200 ml) a TA gota a gota durante 2-3 h. La solución de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante ~ 6 h. El lote se desgasificó a vacío con N₂ tres veces para eliminar el CO₂ generado en la etapa de amidación. Se añadió THF (540 ml, KF <500) a la solución de reacción. A continuación, se añadió una solución de t-BuOK (1,12 mol, 128 g, 97 %) en THF (670 ml) a 0-10 °C gota a gota durante 1-2 h. La solución de reacción se dejó reposar a 0-5 °C durante 1 h.

15 Después, la reacción se inactivó con ácido cítrico al 15 % en peso en agua (0,431 mol, 91 g de ácido cítrico en 515 ml de H₂O) a <10 °C. La fase orgánica se lavó con 480 ml de NaCl semisaturado en agua y el disolvente se cambió a IPA a un volumen final de ~1,25 l con agua ~ 10 % en IPA a <45 °C. El lote se calentó a 40-50 °C. Se añadió agua (1250 ml) gota a gota a 40-50 °C durante 2 h dando como resultado una suspensión.

20 La suspensión se enfrió a temperatura ambiente (20 °C) y se dejó reposar durante 1-2 h antes de la filtración. La torta húmeda de i-3 fue lavada por desplazamiento con IPA 30 % en agua (640 ml x 2). La aspiración en seco a temperatura ambiente o en un horno seco a vacío <50 °C con barrido de N₂ dio 227 g de sólido cristalino blanco i-3 con un rendimiento del 90 % como se determinó por el método de HPLC descrito a continuación.

Método HPLC

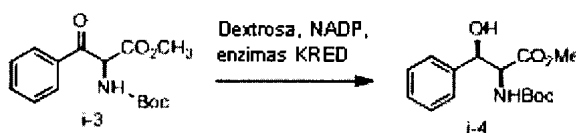
25 Columna: Asentis Express C18, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 2,7 µm;
Temperatura de la columna: 30 °C; Velocidad de flujo: 1,5 ml/min; Detección UV: 210 nm;
Fase móvil: A: H₃PO₄ 0,1 % B: acetonitrilo

Programa de la fase móvil:

Tiempo, min	0	1	5	7	9
A %	95	95	60	10	10
B %	5	5	40	90	90

30

Etapa 2. Preparación del compuesto i-4 a partir del compuesto i-3 mediante reducción DKR



35 A una solución de K₂HPO₄ (14,1 g) en 80 ml de agua a TA se añadió dextrosa (9,8 g) seguido de NADP (360 mg), enzima KRED de SEQ ID NO. 2 (290 mg) y un sistema de reciclado del cofactor de SEQ ID NO. 4 (115 mg). Se ajustó el pH de la solución homogénea resultante a un mínimo de 7,5 con NaOH 2M antes de su uso.

40 Se añadió gota a gota una solución de i-3 (12,0 g) en DMSO (36 ml) a 30 °C a la solución de enzima acuosa anterior a 30 °C durante 4 h con agitación vigorosa. Se añadió gota a gota NaOH 2M (~21 ml) para mantener la mezcla de reacción a un pH de 7,3 a 7,7. Una vez que se hubo añadido 90 % (~19 mL) de la solución de NaOH 2M, la temperatura de reacción se elevó a 35 °C hasta que se alcanzó > 95 % de conversión.

45 Se añadieron a TA IPA (91 ml) y MTBE (49 ml). La capa orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo con IPA/MTBE (140 ml, IPA:MTBE = 20:80). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (50 ml, 10 % p/ v) de salmuera y el producto bruto que contiene el compuesto i-4 se utilizó directamente para el siguiente paso.

Usando el siguiente método de HPLC, los tiempos de retención de i-3 y de i-4 fueron aproximadamente 8,8 y 7,8 minutos, respectivamente

50

Método HPLC

55 Columna: Ace 3 C18, 3 x 150 mm, tamaño de partícula 3 µm
Temperatura de la columna: 30 °C; Velocidad de flujo: 0,75 ml/min; Detección UV: 215 nm;
Fase móvil: A: tampón formiato, pH 4 (1,26 g de HCO₂Na y 0,79 ml de HCO₂H en 1 l de H₂O) B: acetonitrilo

Programa de la fase móvil:	Tiempo (min)	% B
	0	5
	10	95

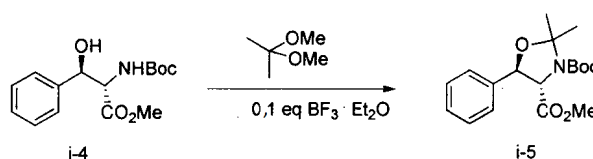
Método SFC quiral

- 5 Columna: Chiralpak IC, 250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm
 Temperatura de la columna: 35 °C; Velocidad de flujo: 2 ml/min; Detección UV: 210 nm; Programa de la fase móvil:

Tiempo, min	0	2	13	15
A %	95	95	60	60
MeOH %	5	5	40	40

Etapa 3. Preparación del compuesto i-5 a partir del compuesto i-4 mediante protección con acetónido

10



15

A una solución en tolueno del éster i-4 (10,6 g, en ~ 25 a 30 ml de tolueno, la solución en bruto de la etapa anterior DKR) se añadieron 50 ml de acetona y 20 ml de 2,2-dimetoxipropano. A continuación se añadió una solución de eterato de BF₃ (0,43 ml) en tolueno (2 ml) mediante una bomba de jeringa a TA durante 2 h. La solución de reacción se dejó reposar a TA durante 15 h. La conversión fue de > 97 % por HPLC. Los tiempos de retención de i-4 e i-5 fueron aproximadamente 4,5 min y 6,5 min, respectivamente.

20

Se añadió gota a gota Et₃N (0,5 ml). Después de reposar durante 15 min adicionales a temperatura ambiente, se cambió el disolvente de la solución a tolueno (~ 30 ml) mientras que la mayoría de la acetona se eliminó a vacío. Se añadió MTBE (60 ml) y la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ 5 %/salmuera (40 ml). La fase orgánica se secó azeotrópicamente y el disolvente se cambió a tolueno hasta un volumen final de ~35-40 ml.

25

Método HPLC

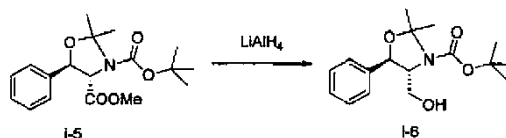
Columna: Asentis Express C18, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 2,7 µm
 Temperatura de la columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 1,5 ml/min; Detección UV: 210 nm;
 Fase móvil: A: H₃PO₄ 0,1 % B: acetonitrilo
 Programa de la fase móvil:

30

Tiempo, min	0	5	7	10
A %	95	15	5	5
B %	5	85	95	95

Etapa 4. Preparación del compuesto i-6 mediante reducción del compuesto i-5

- El compuesto i-6 se puede preparar a partir de la reducción del compuesto i-5 en dos condiciones alternativas.
Opción 1: Reducción con LAH:



40

A una solución del éster i-5 en tolueno (ensayo con 8,28 g, de la etapa de protección anterior, en ~ 2,5 -3 vol de tolueno) se añadió 40 ml de THF. A continuación, la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota LiAlH₄ (solución 2M en THF, 6,9 ml) durante 1 h mientras que la temperatura interna se mantenía a 0-5 °C. La solución de reacción se dejó reposar durante 0,5-1 h adicional. La conversión fue > 99 % por HPLC. A 0-5 °C, se añadió lentamente 0,52 ml de H₂O en 2,0 ml de THF seguido por 0,52 ml de NaOH 15 % seguido por 1,56 ml de H₂O. La mezcla en suspensión se calentó a TA y se filtró a través de Solka-Floc. La torta húmeda se lavó con THF (25 ml) y tolueno (16 ml).

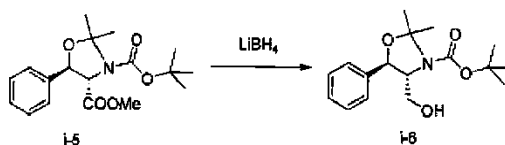
45

Se obtuvo un rendimiento de ensayo del 91 % usando el siguiente método de HPLC. Los tiempos de retención de i-5 e i-6 fueron aproximadamente 6,5 min y 5,7 min, respectivamente.

Método HPLC

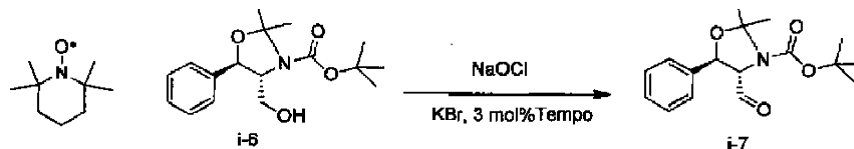
Columna: Asentis Express C18, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 2,7 μm ;
 Temperatura de la columna: 40 $^{\circ}\text{C}$; Velocidad de flujo: 1,5 ml/min; Detección UV: 210 nm;
 Fase móvil: A: H_3PO_4 0,1 % B: acetonitrilo
 Programa de la fase móvil:

Tiempo, min	0	5	7	10
A %	95	15	5	5
B %	5	85	95	95

Opción 2: Reducción con LiBH_4 

Se añadió una solución en bruto del éster i-5 en tolueno (ensayo 11,1 g, de la etapa de protección anterior, en ~ 2,5-3 vol de tolueno) a una mezcla de LiBH_4 (0,937g) en THF (60 ml) durante 15-30 min. A continuación, la solución de reacción se dejó reposar durante 15 horas a 35 $^{\circ}\text{C}$. La conversión fue >97 % por HPLC.

La solución de reacción se enfrió a TA y se inactivó inversamente para dar una solución de NH_4Cl 10 % (40 ml) mientras la temperatura interna se mantenía por debajo de 5 $^{\circ}\text{C}$ con enfriamiento externo. La solución inactivada se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2-3 h o hasta que cesó el desprendimiento de H_2 . Se añadió MTBE (100 ml). La capa acuosa se desechó y se cambió el disolvente para la capa orgánica a tolueno hasta un volumen final de ~ 40 ml, que se utilizó directamente en la etapa de oxidación subsiguiente. El rendimiento del ensayo fue del 92 % y la pérdida acuosa fue del 1,2 %.

Etapa 5. Preparación del compuesto i-7 por oxidación con TEMPO del compuesto i-6

A una solución del alcohol i-6 en tolueno (ensayo 20 g, ~ 60 ml) se añadió acetonitrilo (120 ml) a TA. A continuación se cargaron KBr (1,16 g), NaHCO_3 (1,8 g) y agua (40 ml) dando como resultado una mezcla bifásica. La mezcla bifásica se enfrió a 5 $^{\circ}\text{C}$ y se añadió TEMPO (305 mg). A continuación, se añadió gota a gota la solución de NaClO (Clorox; 101 g; 6 % en peso) a 0-5 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. Después de la adición, la reacción se agitó a 5 $^{\circ}\text{C}$ durante ~ 30 min. Se obtuvo una conversión de > 96 %.

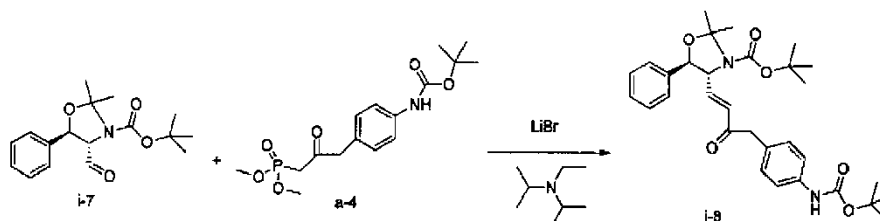
La reacción se inactivó mediante la adición gota a gota de sulfito de sodio 10 % (50 ml) a 5 $^{\circ}\text{C}$. La capa orgánica se separó y se utilizó directamente para la etapa de acoplamiento HWE posterior sin purificación adicional. El rendimiento del ensayo fue de 17,5 g (88 %) por RMN de ^1H usando DMAc como patrón interno.

Los tiempos de retención de i-6 e i-7 utilizando el siguiente método de HPLC fueron de aproximadamente 3,3 min y 3,9 min, respectivamente.

Método HPLC

Columna: Zorbax, Eclipse Plus C18, 4,6 x 50 mm, tamaño de partícula 1,8 μm ;
 Temperatura de la columna: 22 $^{\circ}\text{C}$; Velocidad de flujo: 1,5 ml/min; Detección UV: 210 nm;
 Fase móvil: A: 95/5/0,1, H_2O /Metanol/ H_3PO_4 B: 95/5, MeCN/metanol
 Programa de la fase móvil:

Tiempo, min	0	5	6
A %	60	10	10
B %	40	90	90

Etapa 6. Preparación de i-8 mediante la reacción de acoplamiento de Horner Wadsworth Emmons (HWE)

5 A una solución del aldehído i-7 en tolueno/acetonitrilo húmedo (solución de 162 g; ensayo 17,5 g; 10,81 % en peso) obtenido anteriormente a -10 °C se añadieron acetonitrilo (140 ml), fosfonato a-4 (24,6 g) y LiBr (14,9 g) manteniendo la temperatura interna por debajo de 0 °C.

10 La reacción se calentó hasta 0 °C y se cargó gota a gota base de Hunig (22,2 g) a 0-5 °C durante 2 h. La mezcla de reacción resultante se agitó a 0-5 °C durante 2-4 h y se dejó calentar a TA, seguido de reposo a temperatura ambiente durante 12 h. La HPLC mostró una conversión (producto/(producto + aldehído)) de > 99 %.

15 La suspensión se enfrió a 5 °C y se añadió gota a gota una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % (~ 75 g) para ajustar el pH a 6,5-7,0, manteniendo la temperatura del lote a 0-5 °C. La fase acuosa se separó a 0-5 °C y se desechó.

20 La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado (57 ml) y con H₂O (57 ml) sucesivamente. El disolvente de la fase orgánica se cambió a IPA hasta un volumen final de ~192 ml. El producto cristalizó gradualmente durante la destilación.

25 Se añadió agua (16,4 ml, 0,6 vol.) y la suspensión resultante se calentó a 49 °C para dar una solución homogénea. La solución resultante se enfrió a 40 °C y se sembró (0,27 g). La mezcla resultante se dejó reposar a 40 °C durante 2 h para establecer un lecho de siembra y se cargó gota a gota H₂O (93 ml) a 40 °C durante 3 h, seguido de reposo a 40 °C durante 1 h. La suspensión se dejó enfriar a 5-10 °C durante 2 h, seguido de envejecimiento a 5-10 °C durante 2 h.

30 La torta húmeda se lavó con H₂O/IPA 50 % (un lavado de desplazamiento en frío de 164 ml seguido de un lavado con 110 ml de suspensión). Se secó por succión bajo nitrógeno dio el producto como un sólido blancuzco (24,9 g, 100 % en peso, > 99 LCAP, 80 % de rendimiento aislado a partir del aldehído).

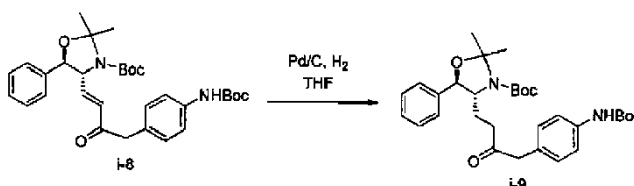
35 Usando el siguiente método de HPLC, los tiempos de retención de i-7, a-4 e i-8 fueron aproximadamente 3,0 min, 1,2 min y 3,8 min, respectivamente.

Método HPLC

35 Columna: Zorbax, Eclipse Plus C18, 4,6 x 50 mm, tamaño de la partícula 1,8 μm
 Temperatura de la columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 1,5 ml/min; Detección UV: 210 nm;
 Fase móvil: A: H₃PO₄ 0,1 % B: MeCN

40 Programa de fase móvil:

Tiempo, min	0	3	7
A %	60	10	10
B %	40	90	90

Etapa 7. Preparación del compuesto i-9 a partir del compuesto i-8

45 Se cargaron en un recipiente de hidrogenación THF (84 g) seguido de la enona i-8 (19,07 g) y paladio sobre carbono al 10 % (0,95 g). El lote se hidrogenó durante 90 min a 25 °C hasta que cesó la absorción de hidrógeno. El catalizador se retiró a través de filtración de un lecho de Solka-Floc. Los residuos filtrados se lavaron con THF (84 g). El disolvente de la fase orgánica combinada se cambió a IPA hasta un volumen final de 142 ml, que se usó directamente en la siguiente etapa. Se obtuvo un rendimiento de ensayo de 93 % (17,8 g de i-9).

50

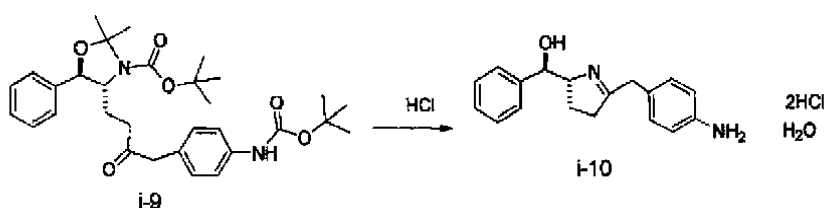
Usando el siguiente método de HPLC, los tiempos de retención de i-8 e i-9 fueron de aproximadamente 11,2 min y 11,4 min, respectivamente.

Método HPLC

Columna: HiChrom ACE C18 (250 x 4,6 mm), tamaño de partícula 3 μm ;
 Temperatura de la columna: 30 $^{\circ}\text{C}$; Velocidad de flujo: 1,0 ml/min; Detección: 210 nm, 254 nm;
 Fase móvil A: 1 ml de ácido fosfórico (85 %) disuelto en 1 l de H_2O B: MeCN
 Programa de la fase móvil:

Tiempo, min	0	5	8	15	16	20
A %	95	65	5	5	95	95
B %	5	35	95	95	5	5

Etapa 8. Preparación del compuesto i-10 a partir del compuesto i-9

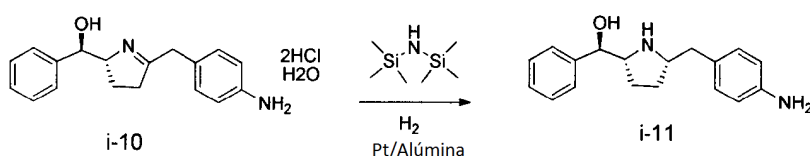


A una solución de la anilina N-Boc-cetona i-9 (ensayo 26,1 kg) en IPA (~125 g/l) se añadió HCl 4 N en IPA (220,8 l) a TA. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 20-25 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. El lote se separó por destilación a presión reducida, a volumen constante cargando IPA hasta un volumen de lote, para eliminar HCl. El lote se concentró hasta un volumen final de ~215 l.

La suspensión resultante se calentó a 45 $^{\circ}\text{C}$ y se añadió lentamente IPAc (~430 l) al lote durante 2-3 h. A continuación se enfrió la suspensión a ~20 $^{\circ}\text{C}$ durante 1-2 h y se dejó en reposo durante la noche. El lote se filtró, y la torta se lavó con una mezcla 1:2 de IPA:IPAc (52 l) seguido de IPAc (52 l). La torta húmeda se secó a 45 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno para dar la sal monohidrato bis-HCl de imina cíclica i-10 (16,1 kg). Se obtuvo el rendimiento aislado del 94 %.

Utilizando el mismo método HPLC que en la Etapa 7 (i-8 a i-9), los tiempos de retención de i-9 e i-10 (sal bis-HCl) fueron aproximadamente 11,3 min y 8,3 min, respectivamente.

Etapa 9. Preparación del compuesto i-11 a partir del compuesto i-10



A una mezcla de diclorhidrato monohidrato de imina i-10 (12,0 g, 98,5 % en peso) en THF (86 ml) en atmósfera de N_2 se añadió hexametildisilazano (10,95 g) manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25 $^{\circ}\text{C}$. La suspensión resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 h.

Se cargó un autoclave de 300 ml con una suspensión de platino sobre alúmina al 5 % (0,605 g) en THF (32 ml), seguido de la suspensión de sustrato preparada anteriormente. La mezcla resultante se agitó a TA bajo hidrógeno (40 psig) hasta que cesó la absorción de hidrógeno. La finalización de la hidrogenación se confirmó mediante HPLC y el recipiente fue inertizado con nitrógeno.

La mezcla de reacción fue desechada y el recipiente se enjuagó con 96 ml de THF. El lote se filtró a través de un lecho de Solka-Floc y la almohadilla se enjuagó con el enjuague del recipiente con THF (~96 ml). El filtrado combinado se agitó con ácido clorhídrico 0,5 M (129 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. La capa acuosa se separó. Se añadió IPAc (39 ml) seguido de hidróxido de sodio 5 N (~15 ml) para ajustar el pH a 10,0 con agitación vigorosa.

La capa orgánica (~120 ml) se separó y se trató con AquaGuard Powder (Meadwestvaco) (2,4 g) a TA durante 2 h. La solución se filtró a través de un lecho de Solka-Floc, y la almohadilla se enjuagó con 2-propanol (18 ml). El filtrado combinado se concentró a 70 ml. La solución se destiló a volumen constante mediante la alimentación de un total de

140 ml de 2-propanol, manteniendo la temperatura del lote a 33-35 °C. La solución resultante se concentró a ~34 ml y se calentó a 50 °C, seguido de adición de H₂O (6,3 ml). La solución resultante se enfrió a 41-43 °C y se sembró con hemihidrato pirrolidina anilina (42 mg). La mezcla resultante se dejó reposar a 41-43 °C durante 1 h para establecer un lecho de siembra.

Se cargó agua (60,9 ml) a 41-43 °C durante 6 h y se dejó que la mezcla resultante se enfriara a 10 °C durante 3 h, seguido de reposo a 10 °C durante 2 h. Los sólidos se recogieron por filtración y se lavaron con 2-propanol 25 %/H₂O (50 ml). La torta húmeda se secó por succión a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno para producir 7,68 g de pirrolidina anilina i-11 como hemihidrato.

RMN de ¹H (d₆-DMSO) δ 7,27 (m, 4 H), 7,17 (m, 1 H), 6,81 (d, J = 8,1, 2 H), 6,45 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 5,07 (s, a, 1 H), 4,75 (s, 2 H), 4,18 (d, J = 7,0 Hz, 1 H), 3,05 (m, 2 H), 2,47 (dd, J = 13,0,6,7 Hz, 1 H), 2,40 (dd, J = 13,0, 6,6 Hz, 1 H), 1,53 (m, 1 H), 1,34 (m, 1 H), 1,22 (m, 2 H).

RMN de ¹³C (d₆-DMSO) δ 146,5, 144,3, 129,2, 127,8, 127,4, 126,8, 126,7, 114,0, 76,8, 64,4, 60,1, 42,1, 30,2, 27,2.

Usando el siguiente método de HPLC, los tiempos de retención de i-10 (sal bis-HCl) e i-11 eran aproximadamente 8,3 minutos y 8,5 minutos, respectivamente.

Método HPLC

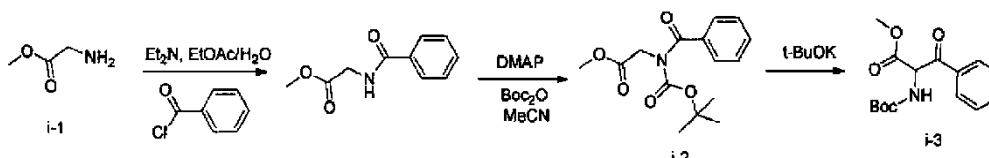
Columna: Waters Xbridge C18, 150 x 4,6 mm, 3,5 μm;
Temperatura de la columna: 25 °C; Velocidad de flujo: 1 ml/min; Detección: 210 nm, 254 nm; Fase móvil: A: Acetonitrilo B: NH₄OH acuoso al 0,1 % ajustado a pH 9,5 con programa de fase móvil H:

Tiempo, min	0	4	8	10	17
A %	99	65	65	30	30
B %	1	35	35	70	70

EJEMPLO 2

Preparación del compuesto i-8 a partir del compuesto i-1 – Condiciones alternativas

Etapa 1. Preparación del compuesto i-3 a partir del compuesto i-1



En un recipiente inertizado 1000 l, se cargó agua (178 kg), seguido de clorhidrato de éster metílico de glicina (sal HCl de i-1, 35,0 kg) para formar una solución. Se cargó EtOAc (178 l; 160,6 kg) y la mezcla se enfrió a 0 °C. Se añadió trietilamina (56,4 kg; 78 l) durante aproximadamente 30 min manteniendo la temperatura interna <10 °C. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de benzoilo (35,6 kg; 29,4 l) durante > 30 minutos manteniendo la temperatura interna <10 °C. El análisis por HPLC al final de la adición de cloruro de benzoilo mostró 100 % de conversión al compuesto intermedio benzoilado.

A continuación se cargó ácido fosfórico 10 % (preparado a partir de 9 kg de ácido fosfórico al 85 % en peso y 81 kg de H₂O) durante 15 minutos y la mezcla se agitó. La capa acuosa inferior se retiró y se volvió a extraer con EtOAc dos veces (178 l; 160,6 kg seguido de 89 l; 80,3 kg). La pérdida de la capa acuosa era aproximadamente 2,1 %.

Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron hasta 50 ~l, a continuación se cargó acetonitrilo (178 l; 140,0 kg) y se concentró hasta ~ 50 l. A continuación se cargó acetonitrilo (178 l; 140,0 kg) y la solución se enfrió a 0 °C y se cargó DMAP (3,09 kg). Se requiere el enfriamiento hasta 0 °C para permanecer por debajo del punto de inflamación del MeCN antes de la carga del sólido a través del acceso.

La mezcla se calentó a 20 °C y se cargó una solución de anhídrido Boc (60,8 kg; 64,7 l) en MeCN (64,7 l; 60,8 kg + 10 l de aclarado) en la mezcla durante 30 min. La mezcla de reacción se dejó reposar durante la noche. El análisis por HPLC mostró una conversión del 100 % al Boc-intermedio.

La mezcla se desgasificó a través de 3 × ciclos de vacío/N₂, se enfrió a 0 °C y se añadió una solución de tBuOK (36,9 kg) en THF (142 l; 126,6 kg) durante 1 h manteniendo la temperatura interna <5 °C. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 1 hora a 5-10 °C. El análisis por HPLC mostró la conversión completa al ceto-éster.

A continuación se añadió a la mezcla ácido cítrico (ac.) 10 % (preparado a partir de 36,5 kg de ácido cítrico y 328,6 kg de H₂O), se agitó y la capa acuosa inferior se eliminó.

5 Se añadió a los extractos orgánicos NaCl (ac.) 5 % (preparado a partir de 14,25 kg de NaCl y 270,8 kg de H₂O), se agitó y la capa acuosa inferior se eliminó. La capa de salmuera inferior se extrajo de nuevo con MTBE (80 kg) y todos los extractos orgánicos combinados.

10 Los extractos orgánicos combinados, lavados, se concentraron hasta ~ 300 l, a continuación se añadió IPA (178 l; 139,7 kg) y se concentró hasta ~285 l (la RMN de ¹H no mostró MeCN residual) y a continuación se añadió IPA (117 kg). La suspensión se calentó a 50 °C para obtener una solución y se añadió H₂O (327,5 kg) durante 1 h manteniendo la temperatura interna a 40-50 °C, después se enfrió a 20 °C durante 45 min y se dejó reposar durante la noche. La pérdida de eluato fue <2 % al final del enfriamiento.

15 La suspensión se filtró y se lavó con IPA/H₂O (38,3 kg: 146,3 kg) y los sólidos se secaron durante la noche a 50 °C al vacío para dar el compuesto cetoéster i-3 en forma de un sólido blanco (65,25 kg; 99,4 LCAP; 100 LCWP). El rendimiento fue de 89 %.

Usando el método de HPLC descrito más adelante, el tiempo de retención de i-3 era aproximadamente 4,0 min.

20 Método HPLC

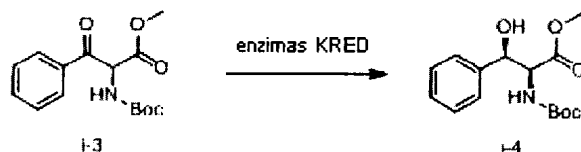
Columna: Ascentis Express C18, 100 x 4,6 mm, tamaño de partícula 2,7 µm;
Temperatura de la columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 1,8 ml/min; Detección: 210 nm, 220 nm, 254 nm;
Fase móvil: A: 1,0 ml de ácido fosfórico 99,9 % (85 % p/p) en 1 l de H₂O B: MeCN

25

Gradiente:

Tiempo, min	0	6	8	9	10
A %	90	5	5	90	90
B %	10	95	95	10	10

Etapa 2. Preparación del compuesto i-4 a partir del compuesto i-3 a través de la reducción DKR



30 Se preparó una solución de tampón fosfato 0,1 M por disolución de fosfato sódico dibásico dihidratado (8,54 kg) en agua (480 kg). El pH se ajustó a 7,0 usando HCl (aproximadamente 1,5 l).

35 En un recipiente de 1000 l se cargó tampón fosfato (400 kg) 0,1 M seguido por DMSO (66 kg). A través del acceso se cargó D-(+)- glucosa (39,2 kg) y NADP sal disódica (0,90 kg) y la mezcla se agitó a 30 °C hasta que todos los sólidos se hubieron disueltos.

40 El tampón de fosfato 0,1 M (88,5 kg) restante se cargó en un recipiente de 400 l, seguido por la enzima KRED de SEQ ID NO. 1 (3,0 kg) y un sistema de reciclado del cofactor de SEQ ID NO. 3 (0,30 kg). Esta mezcla se agitó lentamente a 20 °C hasta que todas las enzimas se habían disueltos. Se debe evitar la agitación violenta para prevenir la formación de espuma en la mezcla. Una vez disuelto, se obtuvo una solución turbia de color amarillo.

En un recipiente de 160 litros se cargó el sustrato ceto éster i-3 (32,6 kg), seguido de DMSO (66 kg). La mezcla se agitó a 30 °C hasta que todo el sólido se había disuelto.

45 El pH de la solución de glucosa/NADP se ajustó desde 7,19 hasta 7,50 con solución de hidróxido de sodio 2 M (2,4 kg).

50 A continuación, la solución de enzima se transfirió al recipiente de 1000 l, seguido de un lavado de la línea de agua (5 kg). El pH de la solución combinada se volvió a ajustar desde 7,30 hasta 7,50 mediante la adición de una solución de hidróxido sódico 2 M (1,9 kg).

La solución de DMSO del éster ceto se cargó a continuación en el recipiente de 1000 l durante aproximadamente 4 h, manteniendo la temperatura en el recipiente de reacción a 30 °C y manteniendo el pH entre 7,3 y 7,7.

55 El material de partida cristalizó durante la adición. La mezcla de reacción se convirtió completamente en una suspensión. El pH se hizo más ácido a medida que la reacción avanzaba. El intervalo de 7,3 a 7,7 se mantuvo

mediante la adición de NaOH 2M.

A continuación, la reacción se dejó en reposo a 30 °C, con el pH mantenido entre 7,3 y 7,7 hasta que se completó la reacción. La reacción se completó en un 90 % después de aproximadamente 5 días. La absorción total de NaOH 2M fue de 55 kg. La absorción total previsto fue de 60 kg.

El proceso de extracción se llevó a cabo en dos mitades debido a limitaciones de volumen del depósito. Las cantidades que se detallan a continuación son para el tamaño total del lote.

Se cargó MTBE (900 l) y metanol (400 l) y la mezcla se agitó y se dejó sedimentar. Se obtuvo una mezcla de dos fases, una capa orgánica transparente superior que contiene el producto y una capa acuosa turbia inferior que contiene todos los residuos de la enzima. La separación era buena, pero requirió un tiempo de estabilización de 30-60 min.

Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con MTBE (300 l). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera al 10 % (150 l). Las pérdidas totales de las capas acuosas fueron 1-2 % del rendimiento teórico.

La capa orgánica se concentró después desde 1.100 l hasta 95 l por destilación a presión reducida. Se cargó tolueno (185 kg) y el lote se concentró hasta un volumen final de 100 l. La temperatura del lote se mantiene por debajo de 40 °C durante la destilación.

El material procesado total fue 64,2 kg. El rendimiento del ensayo fue de 53,9 kg (86 %). Contenía ~ 14 % de cetoeséster i-3. ee > 99,9 %. KF < 250 ppm. MTBE no detectado por RMN de ¹H.

Usando el método de HPLC descrito más adelante, los tiempos de retención de i-3 e i-4 fueron aproximadamente 4,5 min y 3,8 min, respectivamente.

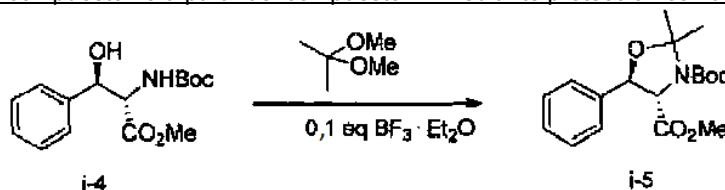
Método HPLC

Columna: Ascentis Express C18, 100 x 4,6 mm, tamaño de partícula 2,7 µm; Temperatura de la columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 1,8 ml/min; Detección: 210 nm; Fase móvil: A: 1,0 ml de ácido fosfórico 99,9 % (85 % p/p) en 1 l de H₂O B: MeCN

Gradiente:

Tiempo, min	0	6	8
A %	90	5	5
B %	10	95	95

Etapas 3. Preparación del compuesto i-5 a partir del compuesto i-4 mediante protección con acetónido



En un recipiente inertizado de 1000 l, se cargó el hidroxiéster i-4 en tolueno (53,9 kg de hidroxiéster; solución total 114,1 kg), seguido de acetona (257 l; 203 kg) y 2,2-dimetoxipropano (97 l; 82 kg) y la mezcla se agitó durante 5 min. Se cargó en la mezcla dietil eterato de trifluoruro de boro (2,20 l; 2,47 kg) durante 30 min y se dejó reposar 15 h durante la noche a 20 °C (no se observó exotermia). El tiempo de reacción fue de ~ 4 horas hasta la finalización; el análisis de HPLC realizado después de transcurrida la noche mostró una conversión > 99 %.

A continuación se cargó trietilamina (2,4 l; 1,76 kg) y la mezcla se concentró hasta un volumen pequeño (~ 100 l). Se cargó MTBE (308 l; 229 kg), seguido de NaHCO₃ 5 % (ac.) (129 l preparado a partir de 6,45 kg de NaHCO₃ y 122,55 kg de H₂O) y NaCl (ac.) 10 % (129 l preparado a partir de 12,9 kg de NaCl y 116,1 kg de H₂O). La mezcla se agitó durante 5 min, las capas se dejaron sedimentar y la capa acuosa inferior se eliminó. Los extractos orgánicos lavados se concentraron hasta ~75 l, después se cargó tolueno (91 l; 105 kg) y se concentró hasta ~ 75 l. A continuación se añadió tolueno (138 l; 119 kg). El tiempo de reacción fue de ~ 4 horas hasta la finalización; el análisis de HPLC realizado después de transcurrida la noche mostró una conversión > 99 %.

A continuación se cargó trietilamina (2,4 l; 1,76 kg) y la mezcla se concentró hasta un volumen pequeño (~ 100 l). Se cargó MTBE (308 l; 229 kg), seguido de NaHCO₃ 5 % (ac.) (129 l preparado a partir de 6,45 kg de NaHCO₃ y 122,55 kg de H₂O) y NaCl (ac.) 10 % (129 l preparado a partir de 12,9 kg de NaCl y 116,1 kg de H₂O). La mezcla se agitó

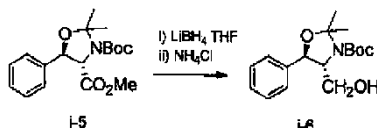
durante 5 min, las capas se dejaron sedimentar y la capa acuosa inferior se eliminó. Los extractos orgánicos lavados se concentraron hasta ~75 l, después se cargó tolueno (91 l; 105 kg) y se concentró hasta ~ 75 l. A continuación se añadió tolueno (138 l; 119 kg).

5 La solución final contenía 176,8 kg y el rendimiento del ensayo del producto acetónido i-5 fue 61,2 kg (100 %). El compuesto ceto éster i-3 todavía estaba presente en 14,2 LCAP.

Utilizando el mismo método HPLC que en la etapa 1 de este ejemplo, los tiempos de retención de i-4 e i-5 fueron aproximadamente 3,2 minutos y 5,2 minutos, respectivamente.

10

Etapa 4. Preparación del compuesto i-6 mediante reducción con borohidruro del compuesto i-5



15 En un recipiente de 1000 L se cargó tetrahidrofurano (218 kg) y una solución de borohidruro de litio 10 % en THF (50,8 kg). La mezcla se agitó y se ajustó la temperatura a 20 °C.

Una solución de éster de acetónido i-5 (que contiene ~ 14 LCAP de ceto éster i-3 pasado a través de la etapa enzimática DKR) en tolueno (55,9 kg de sustrato en un total de 176,8 kg de solución de tolueno) se cargó durante 45 minutos manteniendo la temperatura del lote entre 20 y 25 °C. El lote se calentó a 35 °C y se dejó reposar durante 18 h. Se observó una pequeña reacción exotérmica durante la carga del sustrato. Se observó una mínima liberación de gases. La HPLC mostró < 1 % de material de partida restante.

20

El lote se transfirió a un recipiente de 400 l seguido de un lavado de la línea con THF (10 kg). El recipiente de 1000 l se cargó con una solución de cloruro de amonio (24,5 kg) en agua (245 kg). La solución de cloruro de amonio se enfrió a 0-5 °C y después se cargó el lote durante 90 min, manteniendo la temperatura entre 0 y 5 °C. Se produjo liberación de gas hidrógeno. La velocidad de adición del lote a la solución de enfriamiento rápido de cloruro de amonio fue controlada con el fin de no presurizar el recipiente.

25

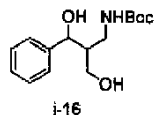
La mezcla de reacción inactivada se calentó a 20 °C y se agitó durante 2 h (hasta que cesó la liberación de gases). La agitación se detuvo y las capas se dejaron sedimentar. La fase acuosa inferior se eliminó y la fase orgánica se lavó con ~ 10 % de salmuera (5 kg de cloruro de sodio en 50 kg de agua). Se observó cierta emulsión en la interfase, por lo que la mayoría de los materiales orgánicos se separaron y la emulsión y la capa acuosa se volvieron a extraer con tolueno (100 kg). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron a presión reducida hasta 100 l (la temperatura del lote se mantuvo por debajo de 40 °C).

30

Se cargó heptano (410 kg) y la mezcla se calentó a 30 °C. El lote se lavó con una mezcla de acetonitrilo (20 kg) en agua (300 kg) durante 20 min. La capa acuosa se eliminó y el lavado se repitió dos veces más. El lavado se llevó a cabo a 30-35 °C para mantener la solubilidad. El compuesto diol i-16 que tiene la siguiente estructura se redujo de 14 a 2.

35

LCAP:



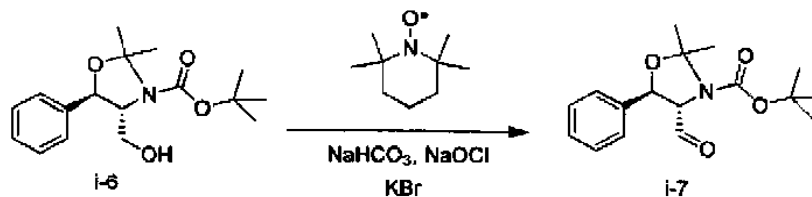
40

A continuación la fase orgánica se concentró hasta 100 l a presión reducida. Se cargó acetonitrilo (120 kg) y el lote se concentró hasta 140 l (142 kg). El rendimiento del ensayo fue 55,6 kg (99 %) y < 2 LCAP de i-16 estaba presente.

Utilizando el mismo método HPLC que en la etapa 2 de este ejemplo, los tiempos de retención de los diastereómeros i-5, i-6 e i-16 fueron aproximadamente de 5,6 min, 4,9 min, 3,0 min y 3,1 min, respectivamente.

45

Etapa 5. Preparación del compuesto aldehído i-7 por oxidación con TEMPO del compuesto i-6



5 En un recipiente revestido de vidrio de 1000 l inertizado se cargó KBr (2,65 kg), NaHCO₃ (4,11 kg) y agua (152 kg). A la solución acuosa se añadió una solución de tolueno/CH₃CN/heptano del alcohol i-6 (142 kg en 39,2 % en peso), seguido de acetonitrilo (83 kg) y tolueno (153 kg). La solución agitada resultante se enfrió a 0-2 °C. Usando una bomba de diafragma, se añadió una solución de TEMPO (0,695 kg) en tolueno (2,8 l) a la mezcla de reacción, lavando la línea y la bomba con tolueno (~1 l).

10 Utilizando una bomba revestida de teflón de aire comprimido, se cargó en el recipiente hipoclorito de sodio (120 kg, 99 l, 13,9 % en peso de cloro activo) a través de una línea de adición por encima de la superficie. A continuación se añadió la solución de hipoclorito de sodio a la mezcla de reacción durante un período de 70 min manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10 °C. La línea de adición se aclaró en el lote con agua (1 kg). El lote se dejó reposar a <5 °C durante 20 min. El hipoclorito de sodio no necesita enfriamiento previo hasta 15 °C, pero no debe estar a temperaturas por encima de la temperatura ambiente (es decir, 23 °C). La velocidad de adición se debe mantener en 60-70 min. Con una velocidad de adición mayor, se necesitarían mayores cantidades tanto de material de partida como del subproducto ácido sobreoxidado, mientras que un tiempo de ejecución más corto probablemente no será posible debido a la actividad exotérmica. La reacción exotérmica cesará tan pronto como se detenga la adición de lejía. En este caso, se obtuvo material de partida 4,0 LCAP, ácido 1,3 LCAP y aldehído 87,4 LCAP. Antes de proceder con el enfriamiento rápido, se añadieron 0,05 eq. más de NaOCl (4 kg), aunque no se volvió a repetir el ensayo del lote.

25 La temperatura del lote se controló a 5 °C y se añadió sulfito de sodio 1 M (total preparado a partir de 5,04 kg de Na₂SO₃ y 35 kg de agua; la cantidad real añadida fue sólo de 18 l de esta solución) y después se añadió durante un período de 10 min, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10 °C. La temperatura del lote se ajustó a 20 °C y se dejó reposar durante 5 min. El lote se ensayó con papel de yoduro de almidón para garantizar que no había presente oxidante.

30 La mezcla bifásica se mezcló durante 10 min y después se dejó sedimentar. La capa acuosa inferior se retiró y se desechó. El corte orgánico superior se lavó con agua (68 kg). El corte acuoso inferior se eliminó de nuevo y se desechó. La capa orgánica se ensayó de nuevo para detectar la presencia de oxidante con papel de yoduro de almidón. (Buen punto de mantenimiento de la solución a 5 °C).

35 Ambos cortes eran muy buenos y sedimentaron con bastante rapidez. El corte orgánico final indicó 1,3 LCAP de material de partida y 91,1 LCAP de aldehído. En ambas capas acuosas, se eliminaron el KBr residual y el subproducto ácido.

40 A continuación, se destiló la solución orgánica, bajo vacío, hasta un volumen final de ~135 l manteniendo la temperatura <40 °C (~ 3 volúmenes basado en el rendimiento de aldehído). El índice KF debe ser <2 % de agua durante la etapa HWE posterior. En este caso el índice KF era 80 µg/ml.

45 Esto proporcionó una solución de 36,8 % en peso de aldehído (131,7 kg en total; 36,8 % en peso, 48,5 kg en el ensayo para i-7; rendimiento del 87 % (ensayo de RMN de ¹H con anisol como patrón interno), que se almacenó en un tambor de acero revestido de plástico bajo nitrógeno a 5 °C, en espera de su procesamiento posterior. Usando el método de HPLC descrito más adelante, los tiempos de retención de i-6 e i-7 fueron aproximadamente 4,9 min y 5,5 min, respectivamente.

Método HPLC

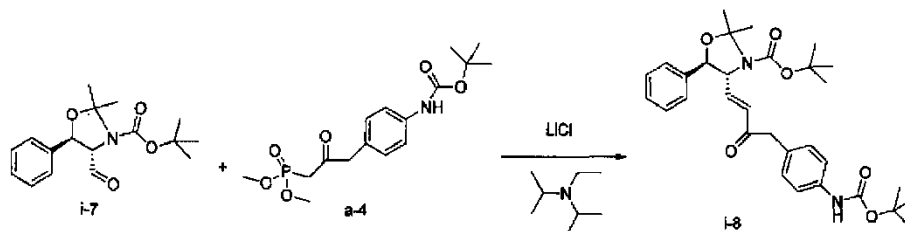
50 Columna: Ascentis Express C18, 100 x 4,6 mm, tamaño de partícula 2,7 µm;
Temperatura de la columna: 40 °C; Velocidad de flujo: 1,5 ml/min; Detección: 210 nm, 254 nm;
Fase móvil: A: 1,0 ml de ácido fosfórico 99,9 % (85 % p/p) en 1 l de H₂O B: MeCN

Gradiente de la fase móvil:

Tiempo, min	0	5	7,5	7,51
A %	90	10	10	90
B %	10	90	90	10

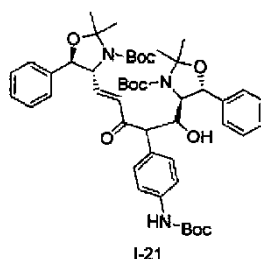
55

Etapa 6. Preparación de i-8 mediante acoplamiento HWE del aldehído i-7 con el compuesto a-4



- 5 Se cargó en un recipiente de 1000 l el fosfonato a-4 (67,4 kg, 1,2 equiv.) y cloruro de litio (19,98 kg, 3 equiv.), seguido de acetonitrilo (188,64 kg). La mezcla se enfrió a ~ 5 °C y se añadió N,N-diisopropiletilamina (60,95 kg, 3 equiv.) manteniendo una temperatura interna por debajo de 20 °C. Una vez se completó la adición, el lote se calentó a 40 °C y se añadió la solución de aldehído i-7 en tolueno de la etapa anterior durante 3 h y después se dejó reposar durante otros 30 min.

10 La adición de la solución de aldehído al iluro preparado tuvo como resultado un nivel muy bajo (~ 1 LCAP) del subproducto dímero de aldol i-21 al final de la reacción:



- 15 El lote se enfrió a 0 °C y se añadió MTBE (177,6 kg) seguido de ácido cítrico (10 % ac.) para ajustar el pH a entre 6,5 y 7 (6,87 alcanzado en la planta). Si se sobrepasaba el pH, se añadía a continuación NaOH 2N convenientemente para ajustar el pH de nuevo en el límite.

- 20 La capa inferior acuosa se eliminó y los extractos orgánicos se lavaron con solución de bicarbonato de sodio 10 % (240 l), después con agua (2 x 120 l). Durante el primer lavado acuoso había algo de sólido en la capa acuosa identificado como sales de ácido cítrico precipitado debido a la súper saturación. Esto se eliminó convenientemente con la capa acuosa.

- 25 El rendimiento del ensayo de la solución final fue de 75,67 kg, 90,1 % en la corriente orgánica (Nota: esto era una estimación basada en el volumen aproximado en el recipiente). Las pérdidas de los cortes acuosos eran <0,1 %.

- 30 La solución se destiló a un volumen mínimo (-100 l) y se añadió alcohol iso-propílico (604,5 kg). A continuación, la solución se destiló hasta un volumen final de 616 l (~ 7 volúmenes + producto) y el lote se calentó hasta 49 °C. Se añadió agua (46,2 kg, 0,6 volúmenes) y el lote se enfrió a 40 °C durante 30 min. El lote se sembró y se dejó reposar durante 1 hora a 40 °C para establecer un lecho de siembra. A continuación se añadió agua (492,8 kg) al lote durante 1 h, manteniendo la temperatura del lote a 40 °C. El lote se dejó reposar durante 2 horas a 40 °C y después se enfrió a 10 °C durante 2 h y se dejó reposar a esta temperatura durante la noche. Después del período de reposo, un ensayo de los eluatos mostró que había una concentración de eluato de 2,9 mg/ml. El lote se filtró y la torta se lavó con 1:1 de IPA:agua (380 l) que se había enfriado a 10 °C. El sólido se secó a vacío a 40 °C. A continuación el co-triturado dio 75,93 kg del producto deseado, 100 LCAP, 99 % en peso, rendimiento del 89 %. Las pérdidas de los eluatos y los lavados fueron del 3 %.

- 40 Habiendo aplicado con éxito este protocolo, se intentó la reacción usando sólo 1,01 equiv de fosfonatos a-4, lo que dio como resultado un rendimiento del ensayo del 99 % al final de la reacción.

Utilizando el mismo método de HPLC que en la etapa 2 de este Ejemplo, los tiempos de retención de a-4 e i-8 fueron de aproximadamente 3,8 min y 6,2 min, respectivamente.

- 45 Usando procedimientos similares a los de las etapas 7-9 del Ejemplo 1, se puede preparar el compuesto i-11 a partir del compuesto i-8.

- 50 Aunque la invención se ha descrito e ilustrado con referencia a ciertas realizaciones particulares de la misma, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden hacer varios cambios, modificaciones y sustituciones. Se pretende, por lo tanto, que la invención esté definida por el alcance de las reivindicaciones que siguen y que tales

reivindicaciones se interpreten tan ampliamente como sea razonable.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> John Y. L. Chung Kevin R. Campos Edward Cleator Robert F. Dunn Andy Gibson
10	Scott R. Hoerner Stephen Keen Dave Lieberman Zhuqing Liu Joseph E. Lynch
15	Kevin Matthew Maloney Feng Xu Nobuyoshi Yasuda Naoko Yoshikawa Yong-Li Zhong
20	<120> PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE AGONISTAS BETA 3 Y PRODUCTOS INTERMEDIOS <130> MRL-BRE-00026-US-PSP
25	<160> 4 <170> PatentIn versión 3.5
30	<210> 1 <211> 249 <212> PRT <213> <i>Exiguobacterium</i> spp.
35	<400> 1

ES 2 584 427 T3

Met Lys Tyr Thr Val Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Tyr Glu
 1 5 10 15

Thr Ala Lys Leu Leu Ala Gly Lys Gly Lys Ser Leu Val Leu Val Ala
 20 25 30

Arg Arg Thr Ser Glu Leu Glu Lys Leu Arg Asp Glu Val Lys Gln Ile
 35 40 45

Ser Pro Asp Ser Asp Val Ile Leu Lys Ser Val Asp Leu Ala Asp Asn
 50 55 60

Gln Asn Val His Asp Leu Tyr Glu Gly Leu Lys Glu Leu Asp Ile Glu
 65 70 75 80

Thr Trp Ile Asn Asn Ala Gly Phe Gly Asp Phe Asp Leu Val Gln Asp
 85 90 95

Ile Glu Leu Gly Lys Ile Glu Lys Met Leu Arg Leu Asn Ile Glu Ala
 100 105 110

Leu Thr Ile Leu Ser Ser Leu Phe Val Arg Asp His His Asp Ile Glu

ES 2 584 427 T3

115 120 125

Gly Thr Thr Leu Val Asn Ile Ser Ser Ala Gly Gly Tyr Arg Ile Val
130 135 140

Pro Asn Ala Val Thr Tyr Cys Ala Thr Lys Phe Tyr Val Ser Ala Tyr
145 150 155 160

Thr Glu Gly Leu Ala Gln Glu Leu Gln Lys Gly Gly Ala Lys Leu Arg
165 170 175

Ala Lys Val Leu Ala Pro Ala Ala Thr Glu Thr Glu Phe Ala Asp Arg
180 185 190

Ser Arg Gly Glu Ala Gly Phe Asp Tyr Ser Lys Asn Val Lys Lys Tyr
195 200 205

His Thr Ala Ala Glu Met Ala Gly Phe Leu His Gln Leu Ile Glu Ser
210 215 220

Asp Ala Ile Val Gly Ile Val Asp Gly Glu Thr Tyr Glu Phe Glu Leu
225 230 235 240

Arg Gly Pro Leu Phe Asn Tyr Ala Gly
245

<210> 2

<211> 249

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Variante modificada por ingeniería genética de cetorreductasa de *Exiguobacterium* spp.

<400> 2

Met Lys Tyr Thr Val Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Tyr Glu
1 5 10 15

Thr Ala Lys Leu Leu Ala Gly Lys Gly Lys Ser Leu Val Leu Val Ala
20 25 30

Arg Arg Thr Ser Glu Leu Glu Lys Leu Arg Asp Glu Val Lys Gln Ile
35 40 45

Ser Pro Asp Ser Asp Val Ile Leu Lys Ser Val Asp Leu Ala Asp Asn
50 55 60

Gln Asn Val His Asp Leu Tyr Glu Gly Leu Lys Glu Leu Asp Ile Glu

ES 2 584 427 T3

65		70		75		80									
Thr	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Gly	Phe	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	Val	Gln	Asp
			85						90					95	
Ile	Glu	Leu	Gly	Lys	Ile	Glu	Lys	Met	Leu	Arg	Leu	Asn	Ile	Glu	Ala
			100					105					110		
Leu	Thr	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Phe	Ala	Arg	Asp	His	His	Asp	Ile	Glu
		115					120				125				
Gly	Thr	Thr	Leu	Val	Asn	Ile	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val
						135						140			
Pro	Asn	Ala	Val	Thr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Lys	Phe	Tyr	Val	Ser	Ala	Tyr
145					150					155					160
Thr	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Gln	Lys	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Arg
				165					170					175	
Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Thr	Glu	Thr	Glu	Phe	Val	Asp	Arg
			180					185					190		
Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Gly	Phe	Asp	Tyr	Ser	Lys	Asn	Val	His	Lys	Tyr
		195					200					205			
His	Thr	Ala	Ala	Glu	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Ile	Glu	Ser
	210					215					220				
Asp	Ala	Ile	Val	Gly	Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Thr	Tyr	Glu	Phe	Glu	Leu
225					230					235					240
Arg	Gly	Pro	Leu	Phe	Asn	Tyr	Ala	Gly							
				245											

<210> 3
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Variante modificada por ingeniería genética de glucosa deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*.

10

<400> 3

Met	Tyr	Pro	Asp	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Ala	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Gly	Lys	Ala	Met	Ala	Ile	Arg	Phe	Gly	Lys	Glu	Gln	Ala

ES 2 584 427 T3

20 25 30
 Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
 35 40 45
 Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
 50 55 60
 Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu
 85 90 95
 Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val
 100 105 110
 Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
 115 120 125
 Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
 130 135 140
 Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
 145 150 155 160
 Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
 165 170 175
 Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
 180 185 190
 Thr Thr Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
 195 200 205
 Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
 210 215 220
 Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser Tyr Val Thr
 225 230 235 240
 Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe
 245 250 255
 Gln Ala Gly Arg Gly
 260

ES 2 584 427 T3

<210> 4
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Variante modificada por ingeniería genética de glucosa deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*.

<400> 4

10

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
 20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
 35 40 45

Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
 50 55 60

Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile
 65 70 75 80

Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu
 85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val
 100 105 110

Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
 115 120 125

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
 130 135 140

Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
 145 150 155 160

Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
 165 170 175

Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
 180 185 190

Thr Thr Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
 195 200 205

ES 2 584 427 T3

Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
210 215 220

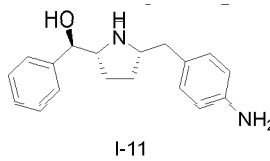
Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser Tyr Val Thr
225 230 235 240

Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Leu Tyr Pro Ser Phe
245 250 255

Gln Ala Gly Arg Gly
260

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de preparación del compuesto I-11:

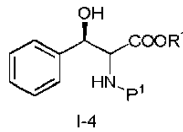


5

que comprende:

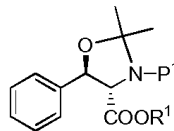
(a) hacer reaccionar el compuesto I-4:

10



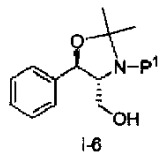
con un reactivo de protección acetónido seleccionado del grupo que consiste en 2,2-dimetoxipropano, 2,2-dietoxilpropano, 2-metoxipropeno y acetona, para producir el compuesto I-5:

15



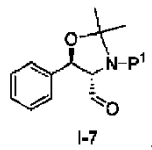
(b) reducir el compuesto I-5 con un agente reductor a una temperatura de 0 °C a 40 °C para producir el compuesto I-6:

20



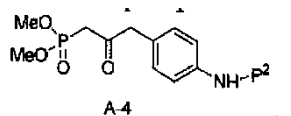
(c) oxidar el compuesto I-6 con un agente oxidante en presencia de un disolvente y un catalizador para producir el compuesto I-7:

25

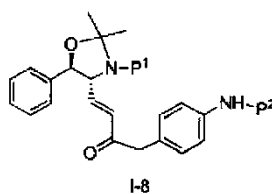


(d) hacer reaccionar el compuesto I-7 con el compuesto de fosfato A-4:

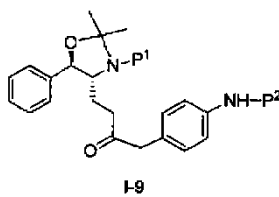
30



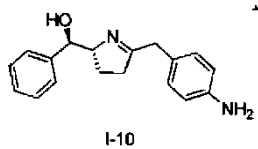
para producir el compuesto I-8:



(e) reducir el compuesto I-8 en presencia de un catalizador para producir el compuesto I-9:



(f) hacer reaccionar el compuesto I-9 con un ácido para producir el compuesto I-10:



y

(g) reducir el compuesto I-10 en presencia de un catalizador para producir el compuesto I-11;

en donde P¹ y P² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts; y

R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, bencilo y fenilo.

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que en la etapa (c):

el disolvente se selecciona del grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno y una mezcla que comprende dos de los disolventes anteriores;

el agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en NaOCl, NaClO₂, peróxido de hidrógeno, trióxido de piridina-azufre, PCC y DCC; y

el catalizador es TEMPO.

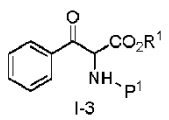
3. El proceso de la reivindicación 1, en el que la reacción entre I-7 y A-4 en la etapa (d) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 a 40 °C y en presencia de un disolvente seleccionado del grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, tolueno y una mezcla que comprende dos de los disolventes anteriores.

4. El proceso de la reivindicación 1, en el que el catalizador utilizado en la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en Pd, Ni Raney, Pt, PdCl₂ y Pd(OH)₂ y la reducción se lleva a cabo en presencia de gas hidrógeno.

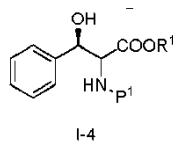
5. El proceso de la reivindicación 1, en el que el ácido de la etapa (f) se selecciona del grupo que consiste en HCl, HBr, TFA, MeSO₃H, TfOH, H₂SO₄, ácido para-toluenosulfónico y RSO₃H en donde R es alquilo, arilo o arilo sustituido.

6. El proceso de la reivindicación 1, en el que la reducción de la etapa (g) se lleva a cabo en presencia de HMDS y el catalizador utilizado se selecciona del grupo que consiste en Pt sobre alúmina, Pd sobre alúmina, Pd/C, Pd(OH)₂-C, Ni Raney, Rh/C, Rh/Al, Pt/C, Ru/C y PtO₂.

7. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además la reducción del compuesto I-3:



en presencia de una enzima KRED para producir el compuesto I-4:

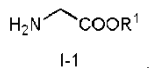


8. El proceso de la reivindicación 7, en el que la enzima KRED se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de SEQ ID NO. 1 y un polipéptido de SEQ ID NO. 2.

9. El proceso de la reivindicación 8, que comprende además un sistema de reciclado del cofactor seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de SEQ ID NO. 3 y un polipéptido de SEQ ID NO. 4.

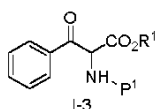
5 10. El proceso de la reivindicación 9, que comprende además un cofactor seleccionado del grupo que consiste en NADH y NADPH.

11. El proceso de la reivindicación 7, que comprende además hacer reaccionar el compuesto I-1:



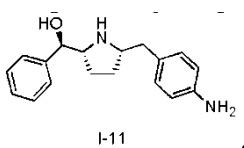
10

con cloruro de benzoilo y un reactivo protector para producir el compuesto I-3:



15

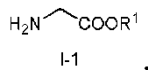
12. Un proceso de preparación del compuesto I-11:



que comprende:

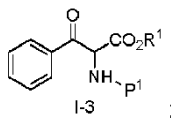
20

(a) hacer reaccionar el compuesto I-1:



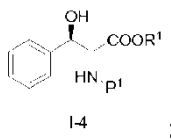
25

con cloruro de benzoilo y un reactivo protector para producir el compuesto I-3:



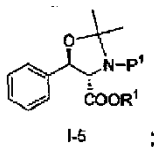
30

(b) reducir el compuesto I-3 en presencia de una enzima KRED para producir el compuesto I-4:



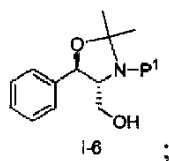
35

(c) hacer reaccionar el compuesto I-4 con un reactivo de protección acetónido seleccionado del grupo que consiste en 2,2-dimetoxipropano, 2,2-dietoxilpropano, 2-metoxipropeno y acetona, para producir el compuesto I-5:



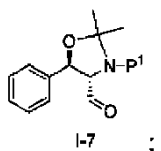
40

(d) reducir el compuesto I-5 con un agente reductor a una temperatura de 0 °C a 40 °C para producir el compuesto I-6:

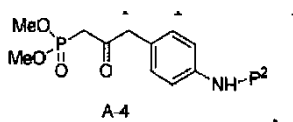


5

(e) oxidar el compuesto I-6 con un agente oxidante en presencia de un disolvente y un catalizador para producir el compuesto I-7:

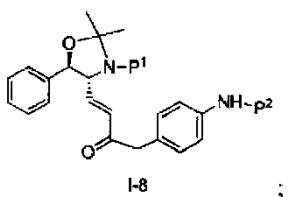


(f) hacer reaccionar el compuesto I-7 con el compuesto de fosfato A-4:



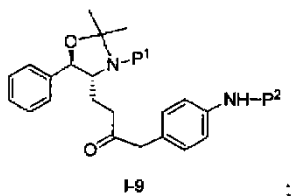
10

para producir el compuesto I-8:



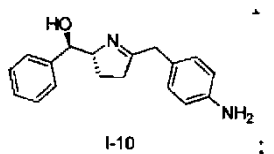
15

(g) reducir el compuesto I-8 en presencia de un catalizador para producir el compuesto I-9:



20

(h) hacer reaccionar el compuesto I-9 con un ácido para producir el compuesto I-10:



25

(i) reducir el compuesto I-10 en presencia de un catalizador para producir el compuesto I-11; en donde P¹ y P² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts; y R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, bencilo y fenilo

30

13. El proceso de la reivindicación 12, en el que la enzima KRED de la etapa (b) se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de SEQ ID NO. 1 y un polipéptido de SEQ ID NO. 2.

35

14. El proceso de la reivindicación 13, en el que la etapa (b) comprende además un sistema de reciclado del cofactor seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de SEQ ID NO. 3 y un polipéptido de SEQ ID NO. 4.

15. El proceso de la reivindicación 14, que comprende además un cofactor seleccionado del grupo que consiste en NADH y NADPH.