

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 128**

51 Int. Cl.:

**C07D 307/60** (2006.01)

**C07B 53/00** (2006.01)

**C07C 59/74** (2006.01)

**C07C 229/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2014 PCT/IB2014/060140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14155291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2014 E 14717080 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2978748**

54 Título: **Procedimiento e intermedios para la preparación de pregabalina**

30 Prioridad:

**27.03.2013 US 201361805786 P**

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

**18.08.2017**

73 Titular/es:

**PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS (100.0%)  
Operations Support Group  
RingaskiddyCork, IE**

72 Inventor/es:

**DEBARGE, SEBASTIEN;  
ERDMAN, DAVID THOMAS;  
O'NEILL, PADRAIG MARY;  
KUMAR, RAJESH y  
KARMILOWICZ, MICHAEL JOHN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 630 128 T3

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

## DESCRIPCIÓN

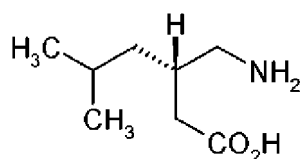
Procedimiento e intermedios para la preparación de pregabalina

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a la fabricación de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona y de los derivados de la misma, para su uso en la fabricación del ácido (S)-(+)-3-aminometil-5-metilhexanoico (pregabalina). La invención también se refiere a un procedimiento mejorado para la conversión de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona en pregabalina. La pregabalina es un  $\gamma$ -aminoácido que muestra una afinidad de unión por la subunidad  $\alpha_2\delta$  del canal de calcio humano.

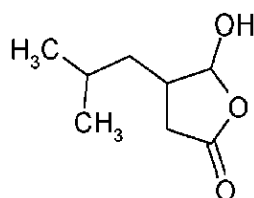
**Antecedentes de la invención**

- 10 La pregabalina, o el ácido (S)-(+)-3-aminometil-5-metil-hexanoico ((S)-II),



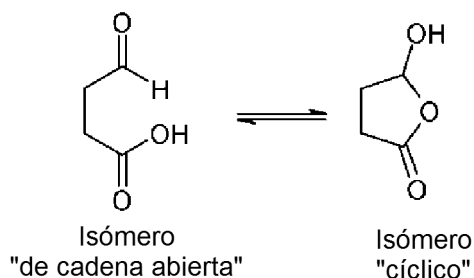
Pregabalina ((S)-II)

- 15 es el agente activo de Lyrica®, que está aprobado para el tratamiento de la epilepsia, el dolor neuropático, la fibromialgia y el trastorno de ansiedad generalizado. Muestra una actividad antiepiléptica, según se analiza en la Patente de EE.UU. US 5.563.175 y una actividad antinociceptiva, según se analiza en la Patente de EE.UU. US 6.001.876. Se ha establecido la hipótesis de que la actividad farmacológica de la pregabalina (II) es el resultado de la unión a la subunidad alfa-2-delta ( $\alpha_2\delta$ ) de un canal de calcio. También se describe que la pregabalina (II) tiene utilidad en otras afecciones, tales como afecciones fisiológicas relacionadas con estimulantes psicomotores, inflamación, daño gastrointestinal, alcoholismo, insomnio y varios trastornos psiquiátricos, incluyendo ansiedad, depresión, manía y trastorno bipolar.
- 20 Se han divulgado diversos procedimientos para la fabricación de la pregabalina. Se ha identificado la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (IA) como un precursor útil.



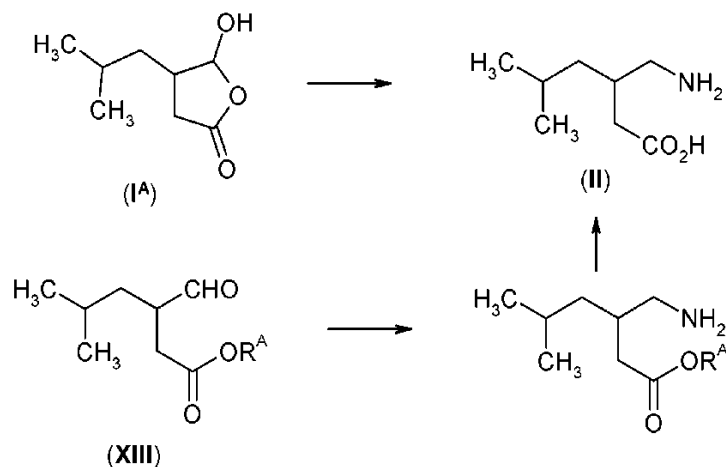
(IA)

- 25 Se apreciará que el compuesto (IA), en común con varios de los otros compuestos analizados en el presente documento, puede considerarse el isómero ciclado de un derivado del ácido 4-oxobutanoico. Los derivados del ácido 4-oxobutanoico pueden existir bien en la forma de cadena abierta o bien en la forma cíclica.

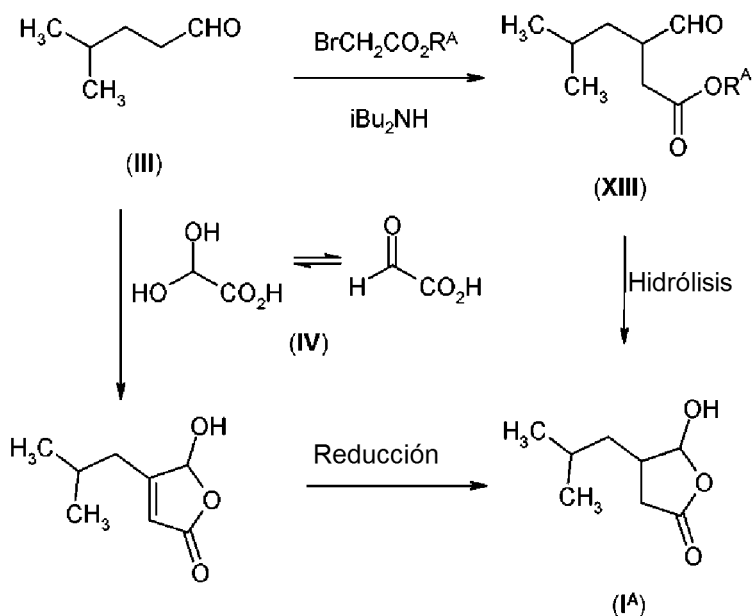


- 30 Estas dos formas isómeras pueden coexistir en equilibrio y las contribuciones relativas de las dos formas dependerán de la naturaleza química precisa de la especie. El documento WO03/093220 desvela una síntesis para la fabricación de la pregabalina partiendo del ácido mucoclórico o mucobrómico. La Solicitud de Patente Internacional PCT/US2008/004699 (publicada como el documento WO2008/127646A2) propone la conversión de la

5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (**I<sup>A</sup>**) o un éster de la forma isómera con el anillo abierto (**XIII**, en la que R<sup>A</sup> es alquilo) en (**II**) utilizando una aminación reductora química o enzimática. Se sugiere que el uso de una enzima transaminasa proporcionará selectivamente el enantiómero preferido ((S)-II).



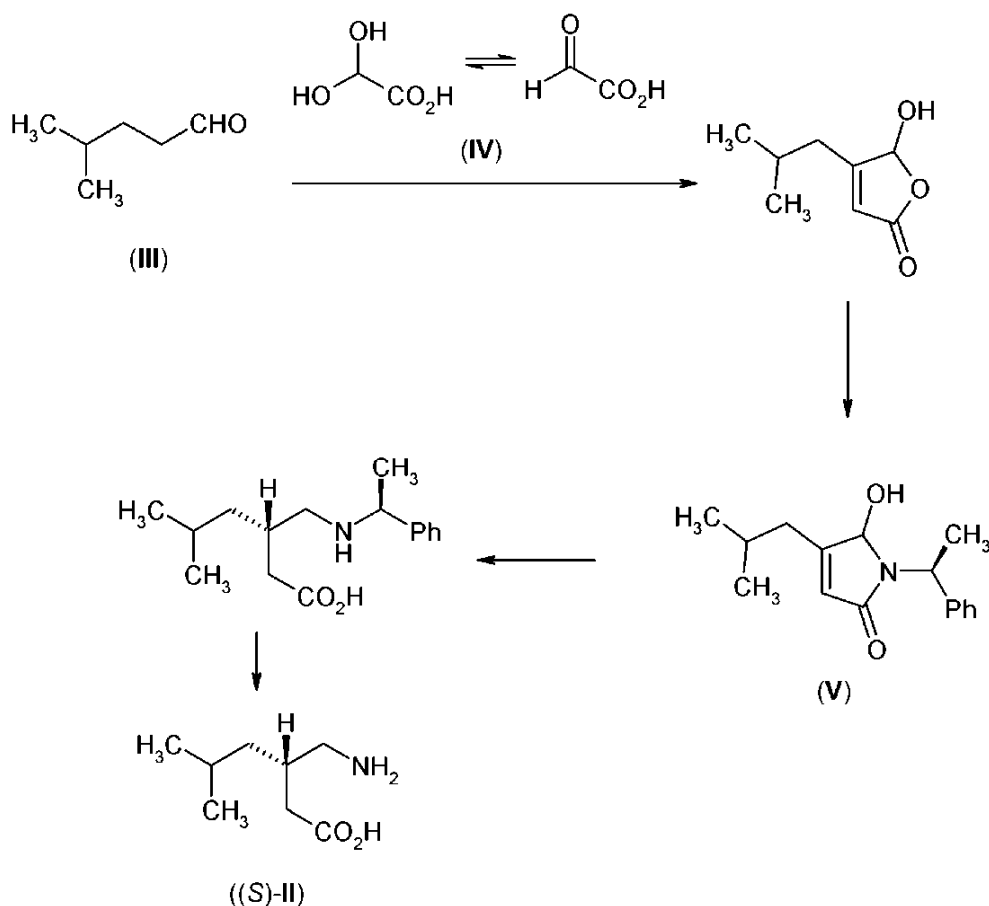
- 5 El éster (**XIII**) se preparó a partir del 4-metilpentanal (**III**) mediante una alquilación con un haloacetato apropiado en presencia de diisobutilamina. El precursor (**I<sup>A</sup>**) se elabora bien mediante una hidrólisis éster del éster (**XIII**) o bien mediante la condensación del 4-metilpentanal (**III**) con ácido glioxílico (**IV**) y la posterior reducción del doble enlace. También se sugiere el uso de una reducción enzimática común como una forma de introducir la estereoquímica deseada.



10

La Solicitud de Patente Internacional PCT/IN2010/000140 (publicada como el documento WO2011/086565) divulga un procedimiento relacionado. Se hace reaccionar el producto de condensación del 4-metilpentanal (**III**) y el ácido glioxílico (**IV**) con una amina quiral tal como la  $\alpha$ -metilbencilamina para dar una pirrolona (**V**). La hidrogenación proporciona un cierto grado de estereoselectividad, y la desprotección proporciona la pregabalina (**II**) en su forma quiral.

15

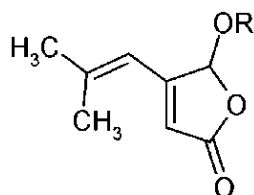


5 Se aspira a unas síntesis todavía más mejoradas de la pregabalina (II). Es especialmente deseable proporcionar un procedimiento que sea rentable y seguro. En particular, es importante proporcionar una síntesis de la pregabalina (II) que pueda llevarse a cabo a escala comercial, que use unos materiales de partida y unos reactivos fácilmente disponibles, asequibles y seguros, y que evite la necesidad de realizar separaciones dificultosas.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos mejorados para la fabricación de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (I<sup>A</sup>) y de intermedios que son útiles en estos procedimientos mejorados.

En un primer aspecto **A1**, la invención proporciona un compuesto según la fórmula (VI)



10 En una primera realización **A1E1**, la invención proporciona un compuesto según la fórmula (VI) en el que R se selecciona entre:

- 15 hidrógeno,
- alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),
- alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),
- cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),
- 20 cicloalquil (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o

3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), arilo, que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), arilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), R<sup>1</sup>-C(O)-, y R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-;

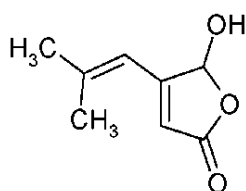
R<sup>1</sup> se selecciona entre:

hidrógeno,  
 alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
 haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
 alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
 alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
 cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
 cicloalquil (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
 arilo, que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y  
 arilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),

y R<sup>2</sup> se selecciona entre:

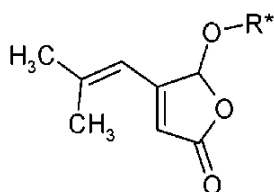
alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
 haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
 alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
 alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
 cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
 cicloalquil (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
 arilo, que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y  
 arilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>).

En una realización adicional **A1E2**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A1E1** en el que R es hidrógeno, de forma que el compuesto de fórmula **(VI)** es la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona según la fórmula **(VI<sup>A</sup>)**.



**(VI<sup>A</sup>)**

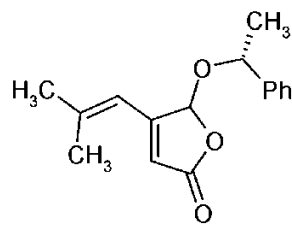
En una realización adicional **A1E3**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A1E1** de fórmula **(VI<sup>B</sup>)**



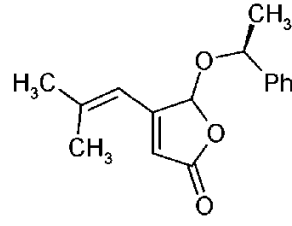
**(VI<sup>B</sup>)**

en el que R\* es un grupo hidrocarbonado quiral (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>).

En una realización adicional **A1E4**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A1E3** en el que R\* se selecciona entre (R)- o (S)- $\alpha$ -metilbencilo, (R)- o (S)-1-(1-naftil)etilo, (R)- o (S)-1-(2-naftil)etilo, mentilo y bornilo, de forma que el compuesto de fórmula (VI) es el compuesto de fórmula (VI<sup>c</sup>) - (VI<sup>k</sup>).

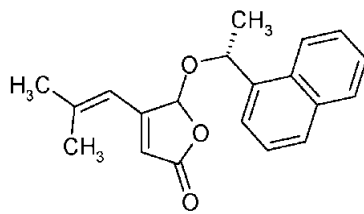


(VI<sup>c</sup>)

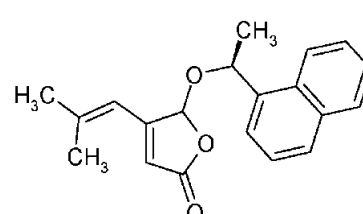


(VI<sup>d</sup>)

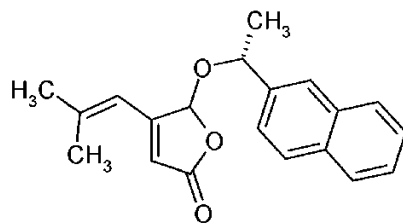
5



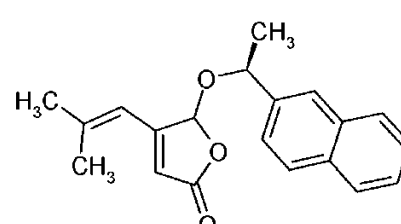
(VI<sup>e</sup>)



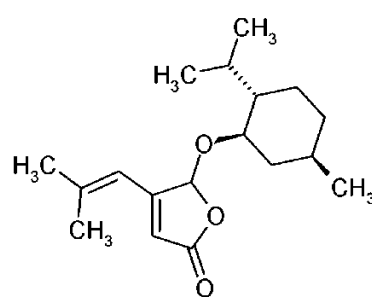
(VI<sup>f</sup>)



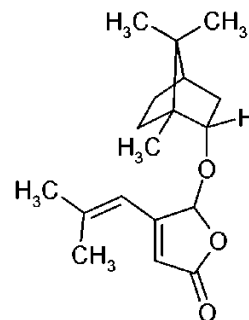
(VI<sup>g</sup>)



(VI<sup>h</sup>)



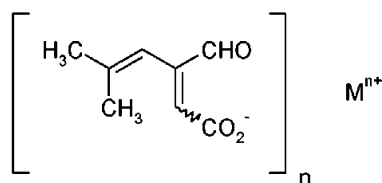
(VI<sup>j</sup>)



(VI<sup>k</sup>)

En una realización adicional **A1E5**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A1E1** en el que R es R<sup>1</sup>-C(O)- o R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, y R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son grupos hidrocarbonados quirales (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>).

10 En otro aspecto A2, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IX)



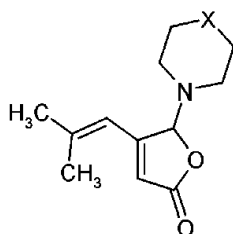
(IX)

El compuesto de fórmula (IX) puede existir como el isómero geométrico (E) o (Z), o en forma de una mezcla de los dos isómeros geométricos.

5 En una primera realización **A2E1**, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IX) en el que: n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>4</sub>N<sup>+</sup>; o n es 2 y M<sup>2+</sup> se selecciona entre Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>.

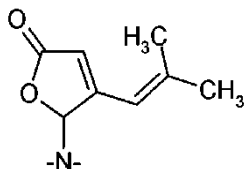
10 En una realización adicional **A2E2**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A2E1** en el que n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. En una realización adicional **A2E3**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A2E1** en el que n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

En otro aspecto **A3**, la invención proporciona un compuesto de fórmula (VII).



(VII)

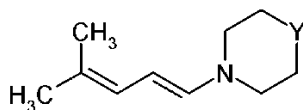
En una primera realización **A3E1**, la invención proporciona un compuesto de fórmula (VII) en el que -X- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-; -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-; -N(bencil)-, o



15 En una realización adicional **A3E2**, la invención proporciona un compuesto según la realización **A3E1** seleccionado entre:

20 4-(2-metilpropenil)-5-pirrolidin-1-il-5H-furan-2-ona;  
4-(2-metilpropenil)-5-piperidin-1-il-5H-furan-2-ona;  
4-(2-metilpropenil)-5-morfolin-4-il-5H-furan-2-ona; y  
1,4-bis-(4-(2-metilpropenil)-5H-furan-2-on-5-il) piperazina.

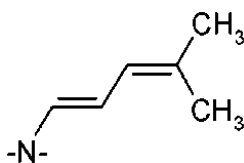
En otro aspecto **A4**, en el presente documento también se desvela un compuesto de fórmula (VIII).



(VIII)

9

25 En una primera realización **A4E1**, se desvela un compuesto de fórmula (VIII) en el que -Y- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-; -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-; -N(bencil)-, o



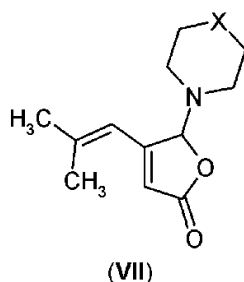
En una realización adicional **A4E2**, en el presente documento se desvela un compuesto según la realización **A4E1** seleccionado entre:

- 5 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) morfolina;  
 1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-piperazina,  
 1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-4-metilpiperazina,  
 4-etil-1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-piperazina,  
 4-bencil-1-(4-metil-1,3-pentadien-1-il)-piperazina y  
 1,4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) piperazina.

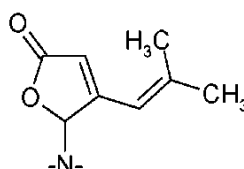
- 10 En otro aspecto **A5**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación del compuesto de fórmula **(VIA)** que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula **(VII)** con agua en presencia de un catalizador ácido.

En una primera realización **A5E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación del compuesto de fórmula **(VIA)**, que comprende las siguientes etapas:

- 15 (a) la preparación de un compuesto de fórmula **(VII)**



en el que -X- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(bencil)-, o



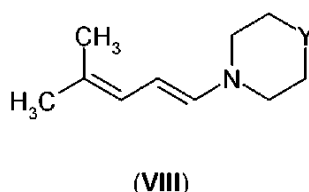
y

- 20 (b) el tratamiento del compuesto de fórmula **(VII)** con agua en presencia de un catalizador ácido.

En una realización adicional **A5E2**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A5E1** en el que el compuesto de fórmula **(VII)** de la etapa (a) se aísla antes de la etapa de hidrólisis (b).

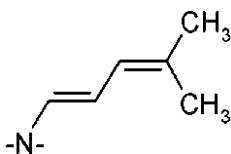
- 25 En una realización adicional **A5E3**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A5E1** en el que la etapa de hidrólisis (b) se lleva a cabo directamente después de la etapa (a), de forma que el compuesto de fórmula **(VII)** o **(VII)<sup>B</sup>** no es aislado antes de la etapa de hidrólisis (b).

En una realización adicional **A5E4**, la invención proporciona un procedimiento según las realizaciones **A5E1**, **A5E2** o **A5E3** en el que el compuesto de fórmula **(VII)** se prepara mediante el tratamiento de un compuesto de fórmula **(VIII)**



en el que -Y- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(bencil)-, o





con ácido glioxílico o su hidrato.

En otro aspecto **A6**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es distinto a hidrógeno,  $R^1-C(O)-$ , y  $R^2-SO_2-$ , que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VIA) con un alcohol R-OH en presencia de un catalizador ácido.

En una realización **A6E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es distinto a hidrógeno,  $R^1-C(O)-$ , y  $R^2-SO_2-$ , que comprende las siguientes etapas:

- (a) la preparación de un compuesto de fórmula (VIA) utilizando un procedimiento según cualquiera de las realizaciones **A5E1**, **A5E2**, **A5E3** y **A5E4** como se han definido anteriormente; y
- (b) el tratamiento del compuesto de fórmula (VIA) con un alcohol R-OH en presencia de un catalizador ácido.

En otro aspecto **A7**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es distinto a hidrógeno,  $R^1-C(O)-$ , y  $R^2-SO_2-$ , que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VII) con un alcohol R-OH en presencia de un ácido estequiométrico.

En una realización **A7E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es distinto a hidrógeno,  $R^1-C(O)-$ , y  $R^2-SO_2-$ , que comprende las siguientes etapas:

- (a) la preparación de un compuesto de fórmula (VII); y
- (b) el tratamiento del compuesto de fórmula (VII) con un alcohol R-OH en presencia de un ácido estequiométrico.

En otro aspecto **A8**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es  $R^1-C(O)-$ , que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VIA) con un cloruro de ácido  $R^1-C(O)-Cl$  o un anhídrido de ácido  $(R^1-C(O))_2O$ .

En una realización **A8E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es  $R^1-C(O)-$ , que comprende las siguientes etapas:

- (a) la preparación de un compuesto de fórmula (VIA) utilizando un procedimiento según cualquiera de las realizaciones **A5E1**, **A5E2**, **A5E3** y **A5E4** como se han definido anteriormente; y
- (b) el tratamiento del compuesto de fórmula (VIA) con un cloruro de ácido  $R^1-C(O)-Cl$  o un anhídrido de ácido  $(R^1-C(O))_2O$ .

En otro aspecto **A9**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es  $R^2-SO_2-$ , que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VIA) con un cloruro de sulfonilo  $R^2-SO_2-Cl$ .

En una realización **A9E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un compuesto de fórmula (VI) en el que R es  $R^2-SO_2-$ , que comprende las siguientes etapas:

- (a) la preparación de un compuesto de fórmula (VIA) utilizando un procedimiento según cualquiera de las realizaciones **A5E1**, **A5E2**, **A5E3** y **A5E4** como se han definido anteriormente; y
- (b) el tratamiento del compuesto de fórmula (VIA) con un cloruro de sulfonilo  $R^2-SO_2-Cl$ .

En el presente documento también se desvela un procedimiento para la fabricación de un derivado de enamina del 4-metil-2-pentanal:

En una primera realización **A10E1**, el procedimiento para la fabricación de un derivado de enamina del 4-metil-2-pentenal comprende la reacción de acetaldehído con isobutiraldehído en presencia de una amina adecuada.

En una realización adicional **A10E2** de la realización **A10E1** la amina adecuada es una amina secundaria.

En una realización adicional **A10E3** de la realización **A10E2** la amina secundaria se selecciona entre: (alquilo ( $C_1-C_4$ )) $_2NH$ , pirrolidina, piperidina, morfolina, piperazina, N-metilpiperazina, N-etilpiperazina y N-bencilpiperazina.

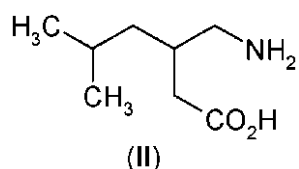
En una realización adicional **A10E4** de la realización **A10E3** la amina secundaria se selecciona entre pirrolidina, piperidina, morfolina y piperazina.

En una realización adicional **A10E5** de un procedimiento según cualquiera de las realizaciones **A10E1**, **A10E2**, **A10E3** y **A10E4** la reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador ácido.

En una realización adicional **A10E6** de un procedimiento según cualquiera de las realizaciones **A10E1**, **A10E2**, **A10E3**, **A10E4** y **A10E5** el isobutiraldehído se combina con la amina adecuada antes de la adición del acetaldehído.

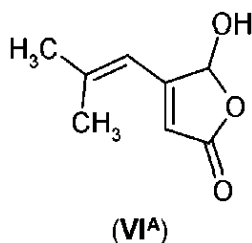
5 En una realización adicional **A10E6** de un procedimiento según cualquiera de las realizaciones **A10E1**, **A10E2**, **A10E3**, **A10E4** y **A10E5** el isobutiraldehído y el acetaldehído son añadidos simultáneamente al recipiente de reacción.

En otro aspecto **A11**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II).

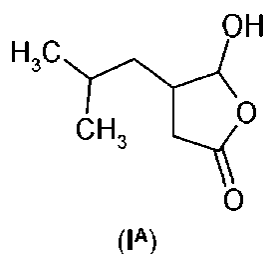


10 En una primera realización **A11E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:

(a) la preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VIA)

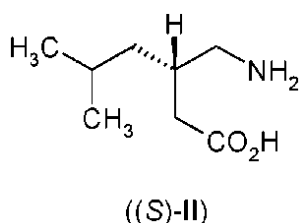


15 (b) la conversión de dicha 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VIA) en la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (IA)



y  
(c) la conversión de dicha 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (IA) en el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II).

20 En una realización adicional **A11E2**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A11E1** en el que el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II) es el ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico ((S)-II)

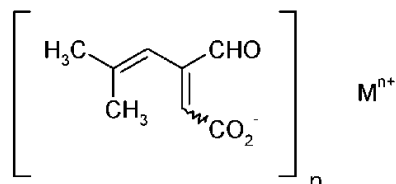


en el que dicho ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico tiene un exceso enantiomérico de al menos el 80 %.

25 En una realización adicional **A11 E3**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A11 E1** o **A11 E2** en el que etapa (a) comprende un procedimiento según las realizaciones **A5E1**, **A5E2**, **A5E3** o **A5E4** como se han descrito anteriormente.

En una realización adicional **A11 E4**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A11 E1**, **A11 E2** o **A11 E3** en el que la etapa (b) comprende las etapas:

- 5 (b1) el tratamiento de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (**VIA**) con un óxido, un hidróxido, un carbonato un bicarbonato metálico, amoníaco, una mono- di- o trialquilamina (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), o un hidróxido de tetraalquilamonio (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), para formar una sal de fórmula (**IX**)

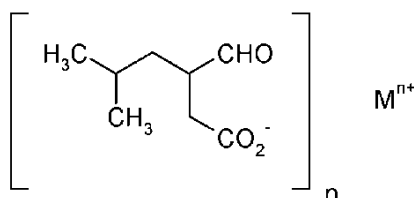


(IX)

en la que:

- 10 n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>4</sub>N<sup>+</sup>; o  
n es 2 y M<sup>2+</sup> se selecciona entre Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>;

(b2) la hidrogenación de la sal de fórmula (**IX**) para obtener una sal de fórmula (X)



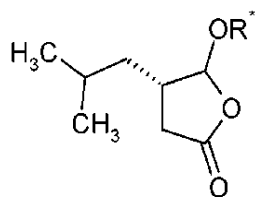
(X)

y

(b3) el tratamiento de la sal de fórmula (**X**) con un ácido.

- 15 En una realización adicional **A11 E5**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A11 E1**, **A11 E2** o **A11 E3** en el que la etapa (b) comprende las etapas:

(b1) la conversión de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (**VIA**) en un compuesto de fórmula (**VI**) según se ha definido en la realización **A1E3**, en el que R es un grupo hidrocarbonado quiral (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>);  
(b2) la hidrogenación del compuesto de fórmula (**VI**) para obtener un compuesto de fórmula (**XI**)



(XI)

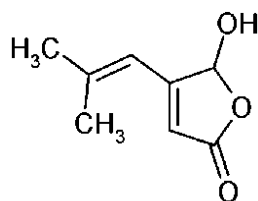
20

en el que R\* es un grupo hidrocarbonado quiral (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>); y  
(b3) el tratamiento del compuesto de fórmula (**XI**) con un ácido para dar ((S)-I<sup>A</sup>).

En otro aspecto **A12**, la invención proporciona un procedimiento adicional para la fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (**II**).

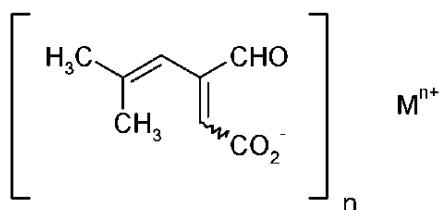
- 25 En una primera realización **A12E1**, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (**II**) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:

(a) la preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (**VIA**)



(VI<sup>A</sup>)

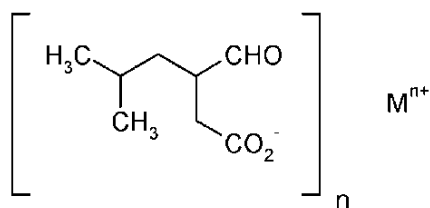
(b) el tratamiento de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VI<sup>A</sup>) con amoníaco o con una monoalquilamina (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) para formar una sal de fórmula (IX<sup>A</sup>)



(IX<sup>A</sup>)

5 en la que n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>

(c) la hidrogenación de la sal de fórmula (IX<sup>A</sup>) para obtener una sal de fórmula (X<sup>A</sup>)

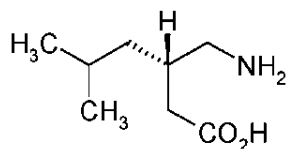


(X<sup>A</sup>)

y

10 (d) el tratamiento de la sal de fórmula (X<sup>A</sup>) con una transaminasa o una enzima oxidasa de amina / reductasa de imina para proporcionar el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II).

En una realización adicional **A12E2**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A12E1** en el que el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II) es el ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico ((S)-II)



((S)-II)

en el que dicho ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico tiene un exceso enantiomérico de al menos el 80 %.

15 En una realización adicional **A12E3**, la invención proporciona un procedimiento según la realización **A12E1** o **A12E2** en el que la etapa (a) comprende un procedimiento según las realizaciones **A5E1**, **A5E2**, **A5E3** o **A5E4** como se han descrito anteriormente.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

20 El término "alquilo" significa un radical hidrocarbonado alifático saturado de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene el número especificado de átomos de carbono. Algunos ejemplos de radicales alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, neopentilo y n-hexilo.

El término "alcoxi" significa un grupo formado por un grupo alquilo como se ha definido anteriormente conectado a un átomo de oxígeno. Algunos ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi e isopropoxi.

5 El término "alcoxi-alquilo" significa un radical hidrocarbonado alifático saturado de cadena lineal o de cadena ramificada en el que un grupo alcoxi está sustituido por un átomo de hidrógeno de un alquilo. Un ejemplo de un grupo alcoxi-alquilo es 2-metoxietilo.

El término "haloalquilo" significa un grupo alquilo como se ha definido anteriormente en el que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos por flúor, cloro, bromo o yodo. Cuando se ha sustituido más de un átomo de hidrógeno, los átomos de halógeno que los sustituyen pueden ser iguales o diferentes. Algunos ejemplos de grupos haloalquilo incluyen fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorodifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo y 3-bromopropilo.

10 El término "arilo" significa un grupo fenilo o naftilo.

El término "aril-alquilo" significa un radical hidrocarbonado alifático saturado de cadena lineal o de cadena ramificada en el que un grupo arilo está sustituido por un átomo de hidrógeno de un alquilo. Un ejemplo de un grupo aril-alquilo es bencilo.

15 El término "cicloalquilo" significa un anillo carbocíclico saturado monocíclico o policíclico que contiene el número especificado de átomos de carbono. Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo policíclicos incluyen biciclo[2,2,1]heptilo y biciclo[3,2,1]octilo.

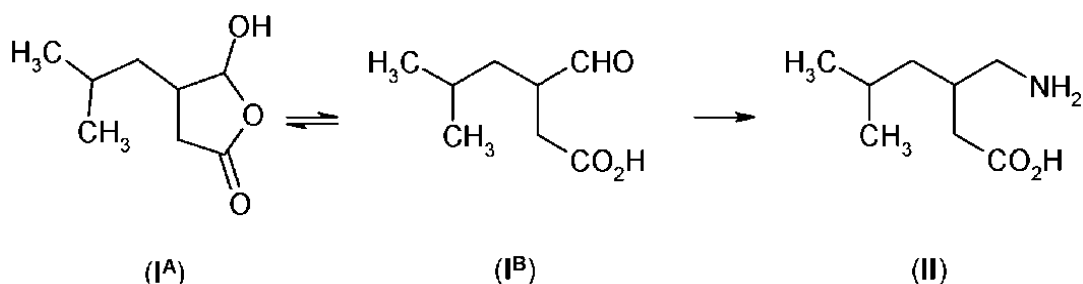
20 El término "opcionalmente sustituido" con referencia a un grupo alquilo o arilo significa que un átomo de hidrógeno del grupo alquilo o arilo puede estar sustituido por uno de los grupos indicados. La sustitución puede tener lugar en cualquier posición del grupo alquilo o arilo. Cuando la sustitución opcional es con "uno o más grupos", entonces puede estar sustituido cualquier número de átomos de hidrógeno del grupo alquilo o arilo, hasta un máximo igual al número de hidrógenos presentes en el grupo alquilo o arilo, y cada sustitución es independiente de las demás.

25 El término "exceso enantiomérico", abreviado en algunas ocasiones como "e.e.", es una medida, para una muestra dada, del exceso de un enantiómero en exceso de su antípoda, y se expresa en forma de un porcentaje. El exceso enantiomérico se define como:

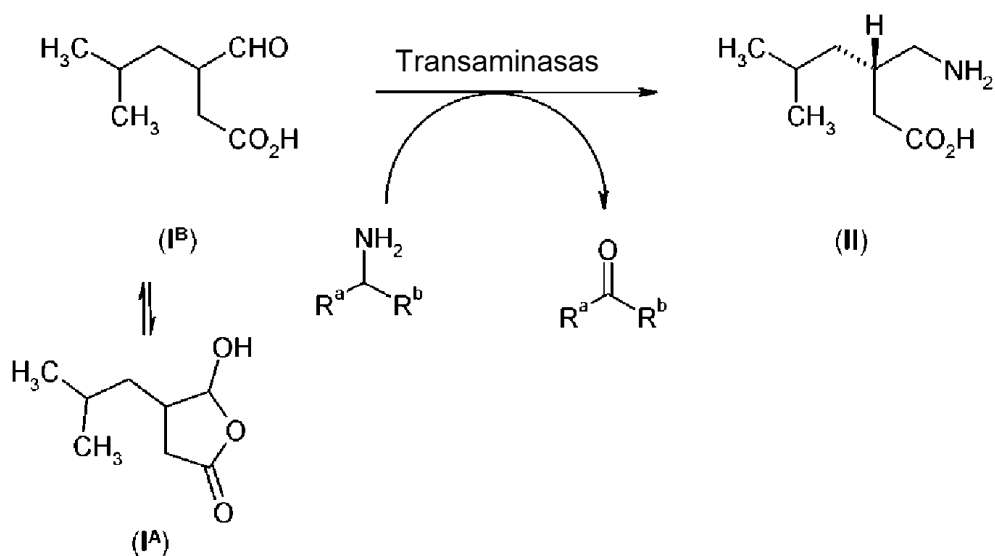
$$100 \times (er-1) / (er +1)$$

en la que "er" es la proporción del enantiómero más abundante con respecto al enantiómero menos abundante.

30 La 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (I<sup>A</sup>) es un intermedio conveniente en la fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II). El tratamiento del racémico (I<sup>A</sup>) con amoníaco en presencia de un agente reductor químico proporciona el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico racémico ((R/S)-II) (véase el documento WO2008/127646A2). Se cree que la reacción implica al isómero con el anillo abierto (I<sup>B</sup>).

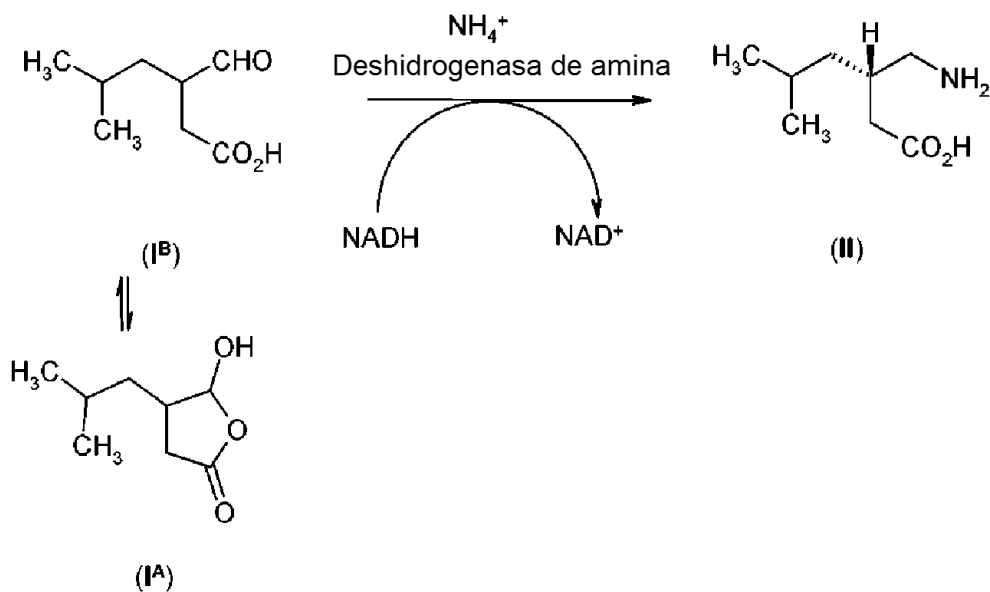


35 La aminación reductora con un donante de amina en presencia de una enzima transaminasa puede proporcionar el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico enriquecido enantioméricamente. Algunos donantes de amina adecuados son aminas primarias tales como monoalquilaminas, particularmente isopropilamina y α-aminoácidos.

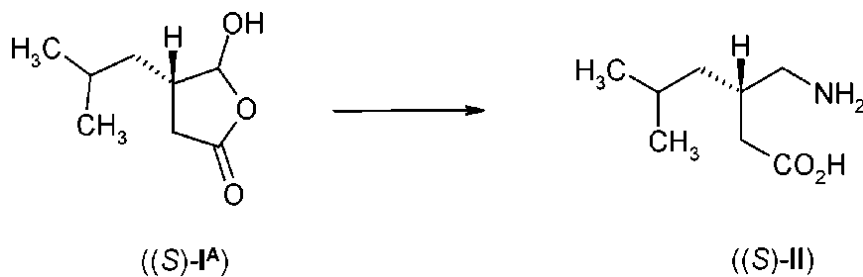


La reacción de (IA) con una deshidrogenasa de amina / reductasa de imina adecuada en presencia de amoníaco también puede ser una ruta adecuada hacia la pregabalina. Puede requerirse un cofactor tal como NADH o NADPH en una cantidad estequiométrica, o puede incluirse una segunda oxidorreductasa, tal como la deshidrogenasa de formiato, para el reciclado del cofactor.

5



Cuando la dihidrofuranona (IA) tiene una estereoquímica definida en la posición C-4, esta estereoquímica puede ser conservada durante la reacción de aminación reductora. Dado que la pregabalina tiene la estereoquímica (S), puede ser preferido tener esta estereoquímica ya presente en la dihidrofuranona.



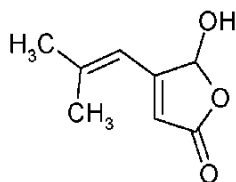
10

Alternativamente, la dihidrofuranona (IA) puede usarse en su forma racémica. El estereoisómero deseado del producto puede obtenerse después bien llevando a cabo la reacción de aminación reductora en unas condiciones

que permitan la formación estereoselectiva de un único enantiómero, tal como llevando a cabo la transformación en presencia de una enzima transaminasa, o bien sometiendo el producto a una etapa de resolución individual, tal como mediante una cristalización con un ácido o una base quiral.

5 La dihidrofuranona (**I<sup>A</sup>**) puede prepararse convenientemente en una forma racémica o enriquecida enantioméricamente utilizando los procedimientos establecidos a continuación.

En un primer procedimiento, la dihidrofuranona (**I<sup>A</sup>**) se prepara mediante la reducción de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (**VI<sup>A</sup>**).



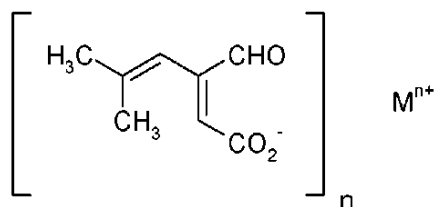
(**VI<sup>A</sup>**)

10 La reducción puede llevarse a cabo convenientemente mediante una hidrogenación en presencia de un catalizador adecuado. Algunos catalizadores adecuados incluyen catalizadores homogéneos y heterogéneos. El catalizador comprende normalmente un metal de transición tal como paladio, platino, rodio, rutenio o níquel, o una sal o un óxido de los mismos. Los catalizadores heterogéneos incluyen metales finamente divididos y metales y óxidos metálicos soportados sobre sustratos, en los que el sustrato puede ser carbono, sílice, alúmina o cualquier otro material inerte adecuado. Algunos catalizadores homogéneos incluyen complejos de ligando con fosfina de metales

15 de transición. Cuando el ligando de fosfina es quiral, entonces el catalizador es quiral. Cuando se usa un catalizador aquiral, entonces el producto es la dihidrofuranona racémica (**I<sup>A</sup>**). El uso de un catalizador quiral puede proporcionar la dihidrofuranona (**I<sup>A</sup>**) de una forma enantioselectiva.

La selectividad de la reacción de hidrogenación y el rendimiento global pueden mejorarse cuando la reacción se lleva a cabo en un medio alcalino. Sin estar ligados a teoría alguna, se cree que en presencia de una base, la furanona existe predominantemente en forma de la sal con el anillo abierto (**IX**).

20

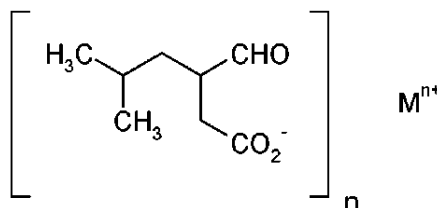


(**IX**)

Puede usarse cualquier base adecuada siempre que no interfiera en el procedimiento de hidrogenación, tal como mediante un envenenamiento del catalizador. Algunos ejemplos de bases adecuadas incluyen óxidos, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinos (tales como Li, Na, K y Rb) y alcalinotérreos (tales como Ca y Mg).

25 También pueden usarse otras sales metálicas, tales como sales de cinc. Las sales de metales alcalinos pueden ser preferidas debido a su buena solubilidad y/o baja toxicidad. Pueden usarse bases de amina tales como amoníaco y aminas primarias, secundarias y terciarias para la preparación de sales de amonio. También puede usarse hidróxido de tetraalquilamonio, dando lugar a la formación de sales de tetraalquilamonio.

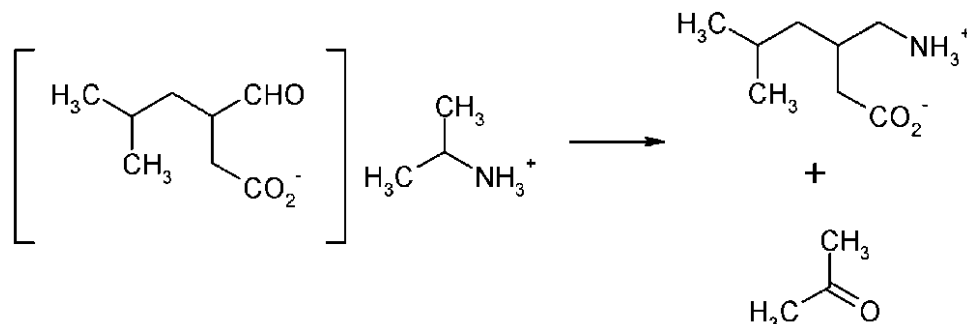
La hidrogenación de la sal de fórmula (**IX**) proporciona una sal de fórmula (**X**).



(**X**)

30 La dihidrofuranona (**I<sup>A</sup>**) se recupera, después de la reacción de hidrogenación, mediante el tratamiento de esta sal con un ácido adecuado. Alternativamente, la sal puede convertirse directamente en el ácido 3-aminometil-5-

metilhexanoico (II) mediante el tratamiento con una enzima transaminasa u oxidasa de amina / reductasa de imina. En este caso puede ser preferible el uso de la sal de amonio ( $M^+ = NH_4^+$ ) o de una sal primaria de alquilamonio ( $M^+ = \text{alquil-NH}_3^+$ ) dado que el ión amonio o alquilamonio proporciona el cosustrato para la enzima. El uso de la sal de isopropilamonio junto con una enzima transaminasa es un ejemplo preferido.



5

Las furanonas de fórmula (VI) en las que R es distinto a hidrógeno también pueden ser reducidas mediante una hidrogenación. Cuando R es un grupo alquilo, haloalquilo, alcoxilquilo alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo o aril-alquilo, estas furanonas pueden prepararse a partir del compuesto de fórmula (VIA) mediante una reacción con un alcohol R-OH en presencia de un catalizador ácido. Cuando R es R<sup>1</sup>-C(O)- las furanonas pueden prepararse a partir del compuesto de fórmula (VIA) mediante una reacción con un anhídrido de ácido (R<sup>1</sup>-C(O))<sub>2</sub>O o un cloruro de ácido R<sup>1</sup>-C(O)-Cl, opcionalmente en presencia de una base, por ejemplo, una amina terciaria. Cuando R es R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>- las furanonas pueden prepararse a partir del compuesto de fórmula (VIA) mediante una reacción con un cloruro de sulfonilo R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-Cl, opcionalmente en presencia de una base, por ejemplo, una amina terciaria.

10

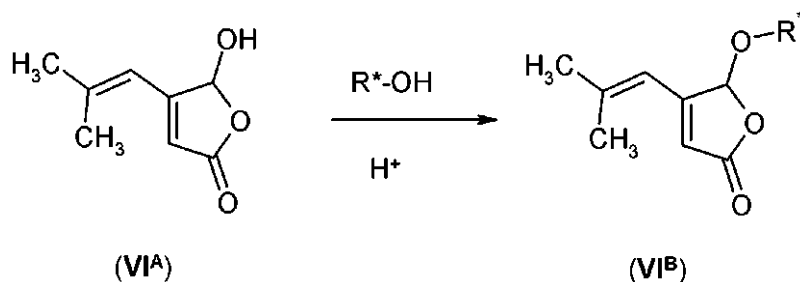
Después de la etapa de hidrogenación, la dihidrofuranona de fórmula (IA) puede ser generada a partir del producto de la reducción mediante el tratamiento con un ácido (en el que R es un grupo alquilo, haloalquilo, alcoxilquilo alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo o aril-alquilo) o una base (en la que R es R<sup>1</sup>-C(O)- o R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-).

15

El uso de un grupo R quiral puede proporcionar un producto de hidrogenación quiral sin la necesidad de un catalizador quiral.

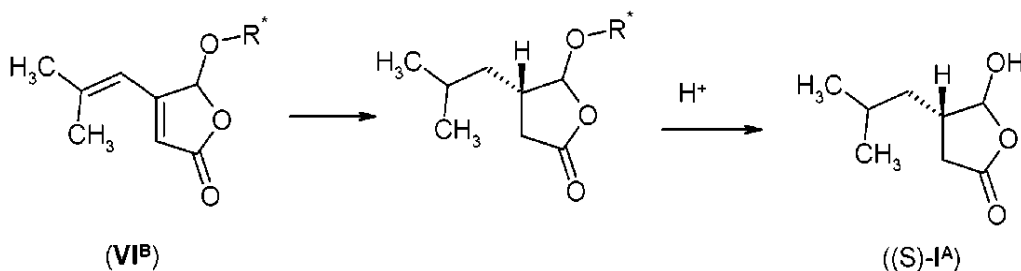
Por ejemplo, se hace reaccionar la furanona (VIA) con un alcohol quiral R\*-OH para proporcionar un derivado de éter quiral (VI<sup>B</sup>).

20



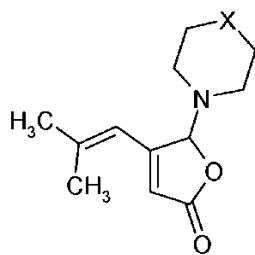
Algunos alcoholes quirales adecuados pueden incluir α-aril alcoholes tales como 1-feniletanol y 1-naftiletanol, así como alcoholes terpénicos tales como mentol y borneol. La hidrogenación del derivado (VI<sup>B</sup>) puede realizarse de una forma enantioselectiva, y el tratamiento del producto resultante con un ácido adecuado y en presencia de agua proporciona entonces la dihidrofuranona (IA) en su forma quiral.

25



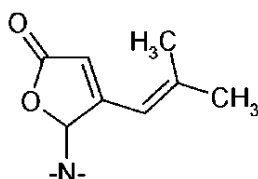
La furanona (VIA) puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula (VII)





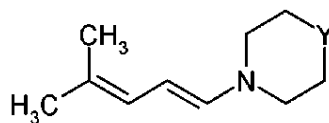
(VII)

en la que -X- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(bencil)-, o



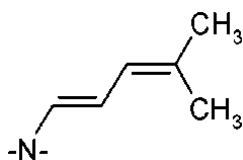
- 5 mediante el tratamiento del compuesto de fórmula (VII) con agua en presencia de un catalizador ácido. Algunos ácidos adecuados incluyen ácidos minerales tales como el ácido sulfúrico. Alternativamente, el compuesto de fórmula (VII) puede tratarse con un alcohol R-OH para proporcionar directamente un compuesto de fórmula (VI) en el que R es un grupo alquilo, haloalquilo, alcoxilalquilo alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo o aril-alquilo.

Los compuestos de fórmula (VII) pueden prepararse mediante la reacción de una dienamina de fórmula (VIII).

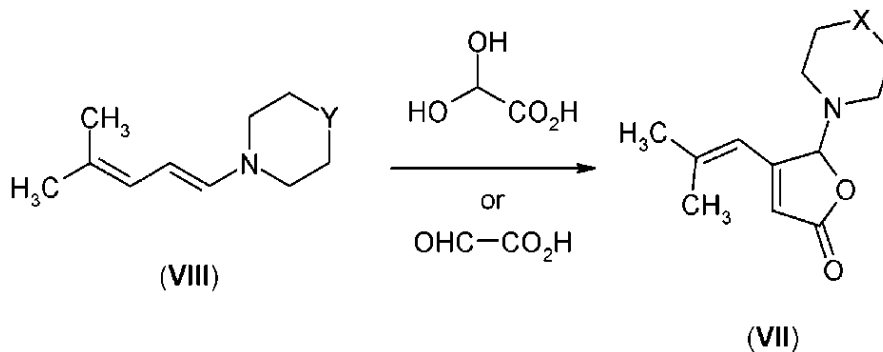


(VIII)

- 10 en la que -Y- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(bencil)-, o



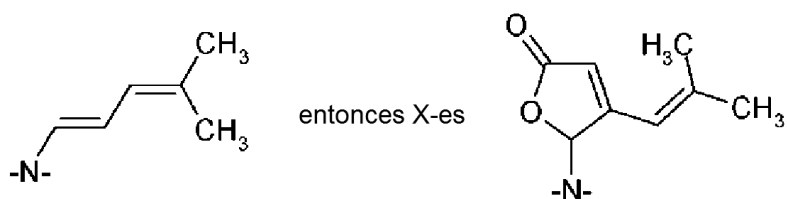
con ácido glioxílico o su hidrato.



(VII)

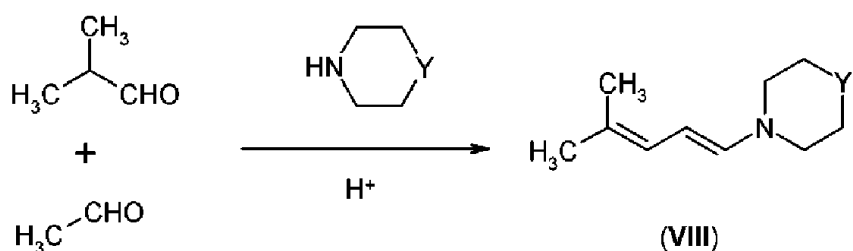
o

- 15 Se entenderá que -X- en la fórmula (VII) se corresponde con -Y- en el material de partida de fórmula (VIII), excepto porque cuando -Y- es



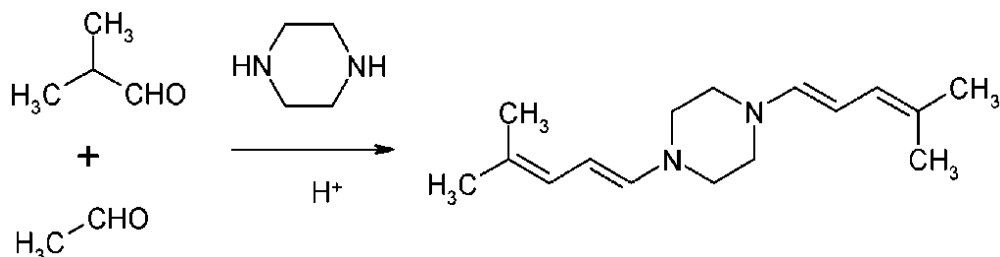
Los compuestos de fórmula (VIII) en los que -Y- representa un enlace sencillo o -CH<sub>2</sub>- se han preparado mediante la reacción del 4-metil-2-pentaldeído con pirrolidina o piperidina (Kienzle, F. et al., Helv. Chim. Acta 1985, 68 (5), 1133-39). Otros compuestos de fórmula (VIII) pueden prepararse de una forma análoga.

- 5 Alternativamente, la condensación de isobutiraldehído y acetaldehído en presencia de una amina adecuada tal como pirrolidina, piperidina o morfolina con un ácido catalítico en un disolvente tal como acetonitrilo, proporciona los derivados de dienamina (VIII).



Y = enlace simple, CH<sub>2</sub>, O, N(alquilo), N(bencilo)

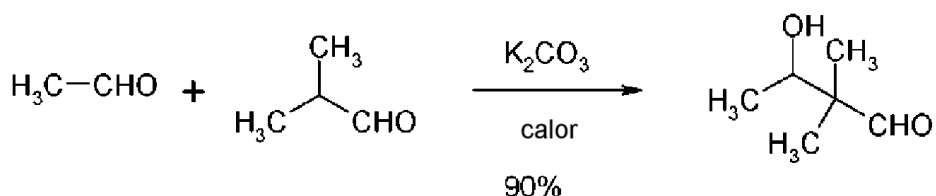
Si se usa piperazina como la amina, entonces se obtiene una *bis*-dienamina.



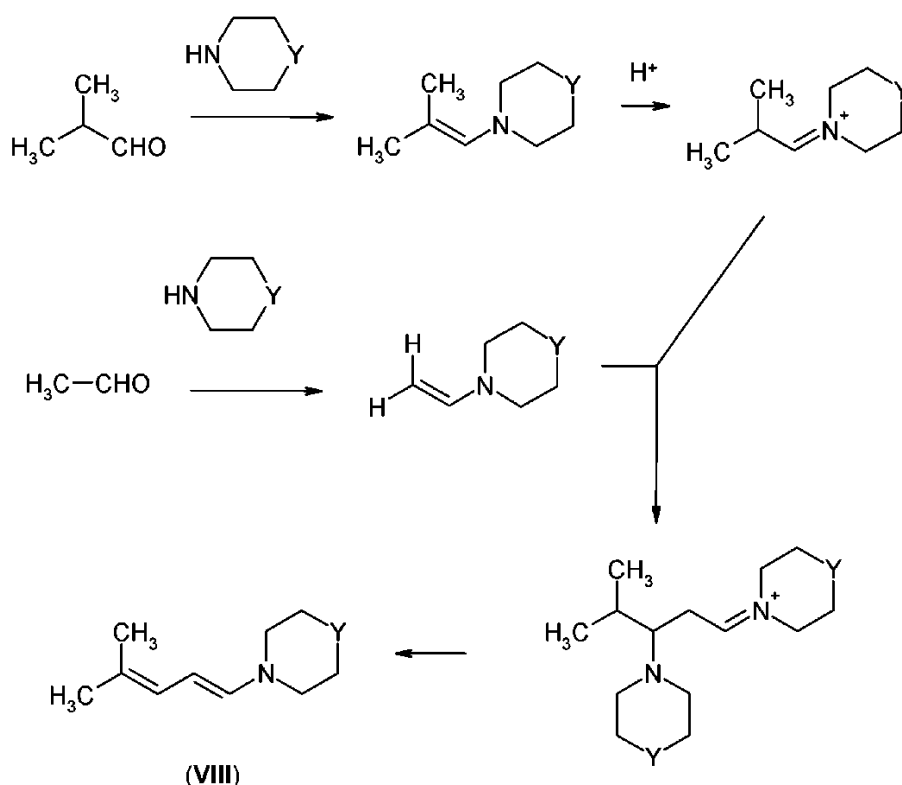
- 10 El compuesto de fórmula (VIII) en la que Y es NH puede obtenerse utilizando una piperazina mono-prottegida como la amina, seguido de una etapa de desprotección.

También pueden usarse aminas secundarias acíclicas tales como dietilamina y di-isopropilamina, pero se prefieren las aminas secundarias cíclicas.

- 15 Este modo de reacción del isobutiraldehído y el acetaldehído difiere de la reacción catalizada con una base directa (por ejemplo, utilizando carbonato de potasio como base: Patente del Reino Unido GB834100) que únicamente proporciona el aducto 2,2-dimetil-3-hidroxitbutanal en la que el isobutiraldehído actúa como un nucleófilo.



- 20 Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, se postula que tanto el acetaldehído como el isobutiraldehído son convertidos inicialmente en sus derivados de enamina. En presencia del catalizador ácido, la enamina de isobutiraldehído más básica se convierte en su ión de iminio. Esta especie electrófila reacciona preferentemente con el nucleófilo menos impedido estéricamente, que es la enamina del acetaldehído – esto asegura que la reacción toma el camino deseado.



5 El procedimiento de la presente invención es más económico y más factible de aumentar en escala que los procedimientos de la biografía que llevan a cabo esta 'inversión' de la reactividad normal del acetaldehído, en la que el acetaldehído se convierte en un derivado enólico O-sililado y se acopla con el isobutiraldehído en unas condiciones de aldol de Mukiyama. En la presente invención, ambos compañeros de acoplamiento son activados simultáneamente – dirigiendo los efectos electrónicos y estéricos el patrón de reactividad observado. La otra ventaja es que el producto dienamina es la deseada forma 'activada' del 4-metil-2-pental para su reacción con el ácido glioxílico, para formar las deseadas 5-aminofuranonas (VII).

10 Estos derivados de dienamina de fórmula (VIII) pueden ser aislados y purificados, o como alternativa, pueden ser tratados directamente con ácido glioxílico (o su hidrato), que proporciona directamente el derivado de furanona (VII).

Los derivados de furanona (VII) pueden ser aislados y purificados. El tratamiento con un ácido acuoso proporciona entonces la furanona (VIA).

Globalmente, las transformaciones establecidas anteriormente proporcionan una ruta corta para la fabricación de pregabalina utilizando unos materiales de partida asequibles y seguros.

## 15 Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes, en los que se usan las siguientes abreviaturas y definiciones:

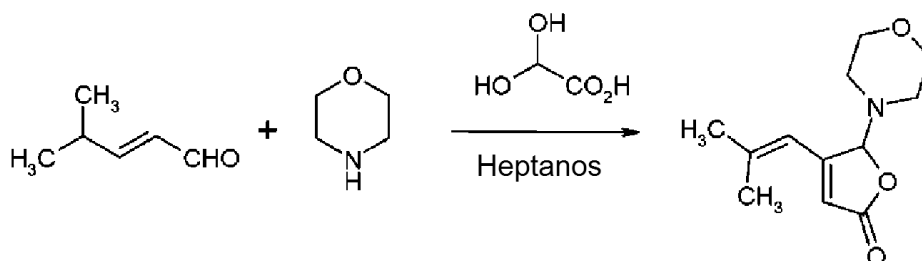
p. eb.	Punto de ebullición
CPME	Ciclopentil metil éter
d	Doblete
DIW	Agua desionizada
dd	Doblete de dobletes
eq	Equivalente
e.e. o ee	Exceso enantiomérico
ES+	Ionización por electronebulización en modo positivo
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases / espectroscopía de masas
HOAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
h	Hora
RMN <sup>1</sup> H	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón

l	Litro
CLEM	Cromatografía de líquidos / espectroscopia de masas
m	Multiplete
mbar	Milibar
MeOH	Metanol
min	Minuto
ml	Mililitro
mmol	Milimol
mol	Mol
p. f.	Punto de fusión
MTBE	Metil terc-butil éter
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado)
NADP <sup>+</sup>	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
PLP	Fosfato de piridoxal
ppm	Partes por millón
pTsOH	Ácido paratoluensulfónico
q	Cuartete
qRMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear cuantitativa
Rf	Factor de retención
TA	Temperatura ambiente
s	Singlete
t	Triplete
ThDP	Difosfato de tiamina
TLC	Cromatografía en capa fina
TsOH	Ácido toluensulfónico (= pTsOH)
UPLC	Cromatografía de líquidos de resolución ultra alta
XRD	Cristalografía de difracción de rayos X
δ	Desplazamiento químico

Los productos químicos comerciales se usaron según se recibieron, salvo que se establezca de otro modo. La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en placas de plástico prerrecubiertas (Merck silica 60F254) y se visualizó utilizando luz UV y una inmersión en KMnO<sub>4</sub>. Los espectros de RMN de protón (<sup>1</sup>H) y de carbono (<sup>13</sup>C) fueron registrados con un espectrómetro Varian INOVA 300 MHz. Los desplazamientos químicos están indicados con respecto a tetrametilsilano y referenciados a los picos del disolvente residuales según sea apropiado. Salvo que se indique de otro modo, el análisis de la HPLC quiral se llevó a cabo utilizando un sistema Agilent 1200 HPLC y los datos fueron procesados utilizando el programa informático Chemstation o con una HPLC semiprep/analítica Varian utilizando el programa informático Galaxie.

## 10 Ejemplo 1

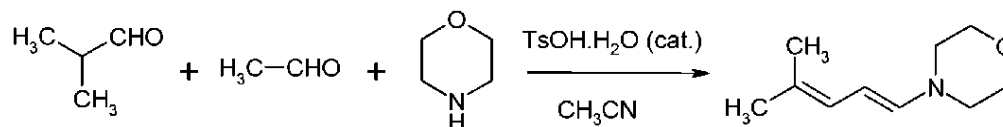
### Preparación de la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-5H-2-furanona a partir del 4-metil-2-pentalen



Se añadió una solución al 50 % de ácido glioxílico en agua (29,6 g, 0,2 mol) a una mezcla bifásica agitada de morfolina (17,8 g, 0,2 mol) y heptanos (75 ml), que había sido enfriada previamente a 0-10 °C. La temperatura se mantuvo por debajo de los 10 °C. La mezcla se calentó hasta 20 °C y se añadió 4-metil-2-pentalen (19,6 g, 0,2 mol). La mezcla se agitó a 45 °C durante 20 h. Se formó una gran cantidad de sólido. Se añadió agua (100 ml) a la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 h. La mezcla se extrajo con ciclopentil metil éter (100 ml) y la solución orgánica se lavó dos veces con agua (100 ml) y se concentró para dar 30,4 g del producto en bruto. Este sólido se purificó mediante una recristalización en metanol (100 ml) para proporcionar 17,7 g (40 %) de la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-5H-2-furanona pura.

CG/EM: m/z = 223

RMN <sup>1</sup>H: δ 6,0 (s, 1 H); 5,9 (s, 1 H); 5,5 (s, 1 H), 3,7 (d, 4H), 2,7 (d, 4H), 2,00 (s, 3H), 1,95 (s, 3H).

**Ejemplo 2****Preparación de 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) morfolina**

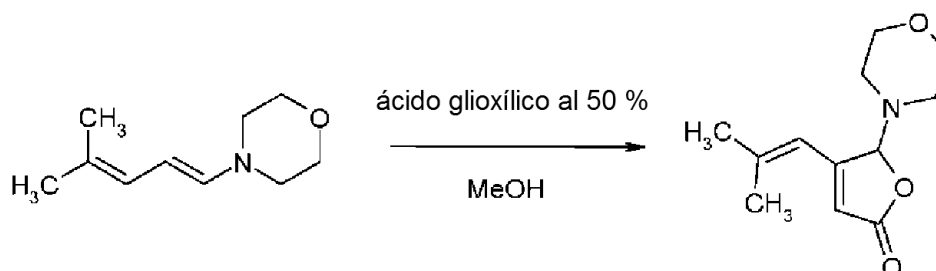
5 Se agitó isobutiraldehído (46,90 g, 0,65 mol, 1,43 eq) en acetonitrilo (300 ml). Se añadieron lentamente morfolina (56,63 g, 0,65 mol, 1,43 eq) seguido de pTsOH (8,63 g, 0,1 eq) a la temperatura ambiente a la solución de isobutiraldehído. Se añadió gota a gota una solución de acetaldehído (20 g, 0,454 mol) en acetonitrilo (100 ml) durante 1 h con una monitorización de la temperatura interna a 50 °C. Después de completar la adición, la mezcla se agitó durante 30 min a 50 °C y después se enfrió hasta la temperatura ambiente antes de la evaporación del disolvente a vacío para dar un aceite de color naranja (123,3 g). El ensayo del bruto mediante una RMN cuantitativa  
10 utilizando benzoato de bencilo como patrón interno era del 40 %, que proporciona un rendimiento del 65 % de la dienamina deseada.

CG/EM: m/z = 167

RMN <sup>1</sup>H: δ 6,01 (d, 1 H); 5,69 (d, 1 H); 5,31 (dd, 1 H), 3,70 (m, 4H), 2,89 (m, 4H), 1,71 (s, 3H), 1,63 (s, 3H).

**Ejemplo 3**

15 **Preparación de la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-5H-2-furanona a partir de la 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) morfolina en bruto**



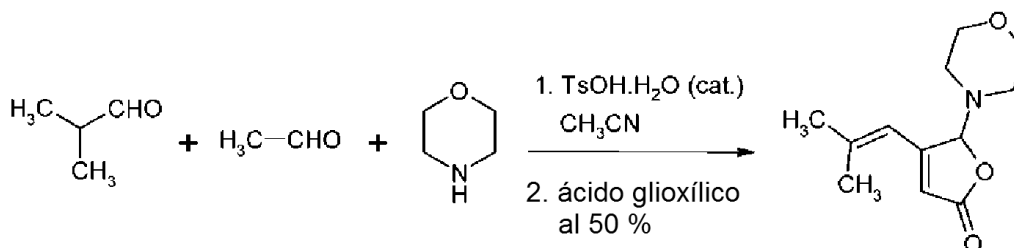
20 Se disolvió la dienamina 4-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) morfolina en bruto del ejemplo 2 (123,3 g, 40 % del ensayo) en metanol (300 ml) a la temperatura ambiente. Tras completarse la disolución, se añadió ácido glioxílico (al 50 % en peso, 60 g, 1,1 eq) y la mezcla bifásica resultante se agitó a 50 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y el disolvente se eliminó mediante una evaporación rotatoria. El residuo se particionó entre acetato de etilo (200 ml) y una solución saturada de carbonato de sodio (200 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml) y los orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se evaporaron hasta un aceite pegajoso que solidificó después de un periodo de reposo (89,0 g, 67 % de ensayo mediante una qRMN, 60 % de rendimiento).  
25

CG/EM: m/z = 223

RMN: como en el ejemplo 1.

**Ejemplo 4**

30 **Preparación de la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-5H-2-furanona en un paso a partir de isobutiraldehído y acetaldehído.**

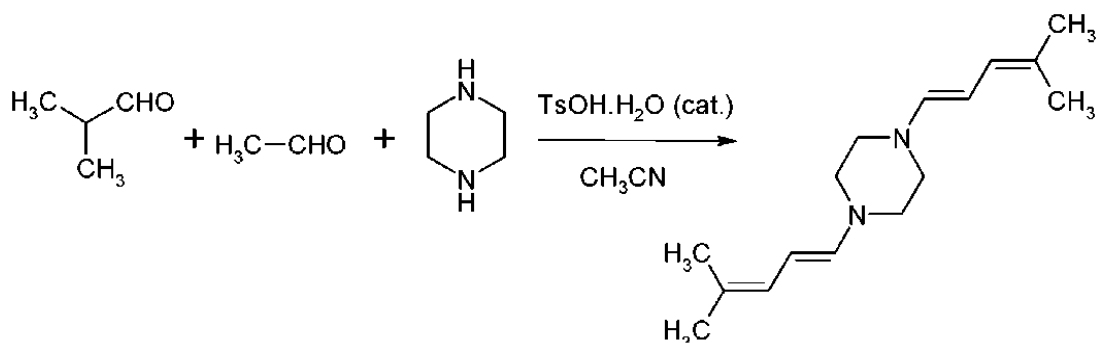


Se agitó isobutiraldehído (102,90 g, 1,43 mol) en acetonitrilo (600 ml). Se añadieron lentamente morfolina (124,3 g, 1,43 mol) seguido de pTsOH (19,0 g, 0,1 eq) a la temperatura ambiente a la solución de isobutiraldehído. Se añadió

gota a gota una solución de acetaldehído (44,05 g, 1,0 mol) en acetonitrilo (150 ml) durante 1 h, monitorizando la temperatura interna a 50 °C. Después de completar la adición, la mezcla se agitó durante 30 min a 50 °C y después se enfrió hasta < 10 °C. Se añadió ácido glioxílico (al 50 % en peso, 211,3 g, 1,43 mol) y la mezcla bifásica resultante se agitó a 50 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y el disolvente se eliminó mediante una evaporación rotatoria. El residuo se particionó entre acetato de etilo (1 l) y una solución saturada de carbonato de sodio (1 l). El acuoso se extrajo con acetato de etilo y los orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se evaporaron hasta un aceite pegajoso que solidificó después de un periodo de reposo (166 g). El producto en bruto se trituró con MTBE a la temperatura ambiente. El producto se recogió mediante una filtración y se lavó con MTBE para dar la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-5H-2-furanona pura (84 g, 37 % de rendimiento) idéntica al material preparado en el Ejemplo 1. El análisis del sólido en bruto (166 g) indicó un rendimiento de aproximadamente el 50 %.

### Ejemplo 5

#### Preparación de la 1,4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) piperazina



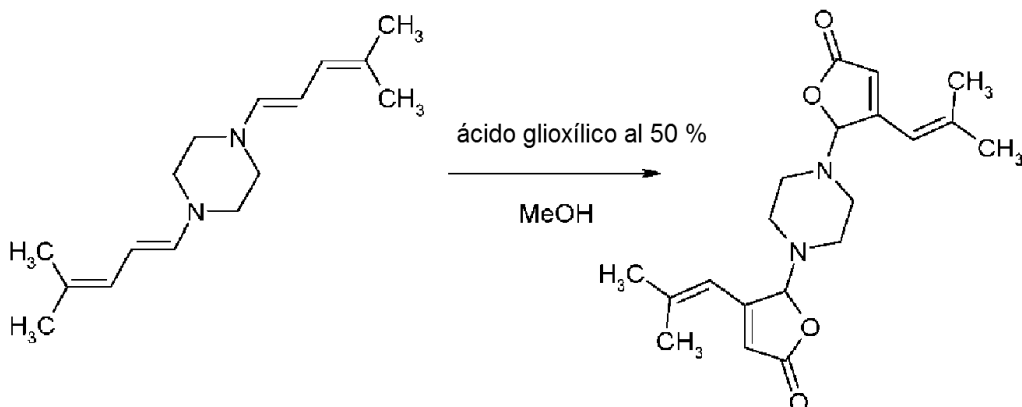
Se preparó una solución de piperazina (43,0 g, 0,5 mol) y ácido 4-toluensulfónico monohidratado (4,4 g, 0,023 mol) en acetonitrilo (600 ml). Esta solución se calentó a 50 °C y se añadió isobutiraldehído (100 ml, 1,10 mol) durante 10 minutos. La solución se volvió de color rojo anaranjado y se produjo un precipitado transitorio de color blanco. Después se añadió una solución de acetaldehído (30,8 g, 0,70 mol) en acetonitrilo (30 ml) mediante una bomba de jeringa durante 3 h a 50 °C. Se formó una suspensión que se agitó a 50 °C durante 0,5 h. El disolvente se eliminó y el sólido residual se aisló en metanol (500 ml) a -5 °C. Se filtró y se lavó con metanol frío y se secó para proporcionar 52,9 g (60 %) de la 1,4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) piperazina.

CG/EM: m/z = 246.

RMN <sup>1</sup>H: δ 6,00 (d, 2H); 5,70 (d, 2H); 5,28 (dd, 2H); 2,92 (s, 8H); 1,73 (s, 6H); 1,68 (s, 6H), RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)-140,6 (C), 126,3 (CH), 123,4 (CH), 100,2 (CH), 48,2 (CH<sub>2</sub>), 25,8 (CH<sub>3</sub>), 18,1 (CH<sub>3</sub>).

### Ejemplo 6

#### Preparación de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) a partir de la 1,4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) piperazina.



Se cargó 1,4-bis-(4-metil-1,3-pentadien-1-il) piperazina (37,3 g, 0,151 mol); véase el Ejemplo 5) en metanol (300 ml). La temperatura se ajustó a 34 °C y se añadió rápidamente una solución al 50 % de ácido glioxílico en agua (44,9 g, 0,302 mol) (durante 5 minutos). La suspensión resultante se agitó a 45 °C durante 15 h; se enfrió hasta 0-10 °C durante 2 h y se filtró. El sólido se lavó con metanol (100 ml) y se secó para proporcionar la 5,5'-(piperazin-1,4-

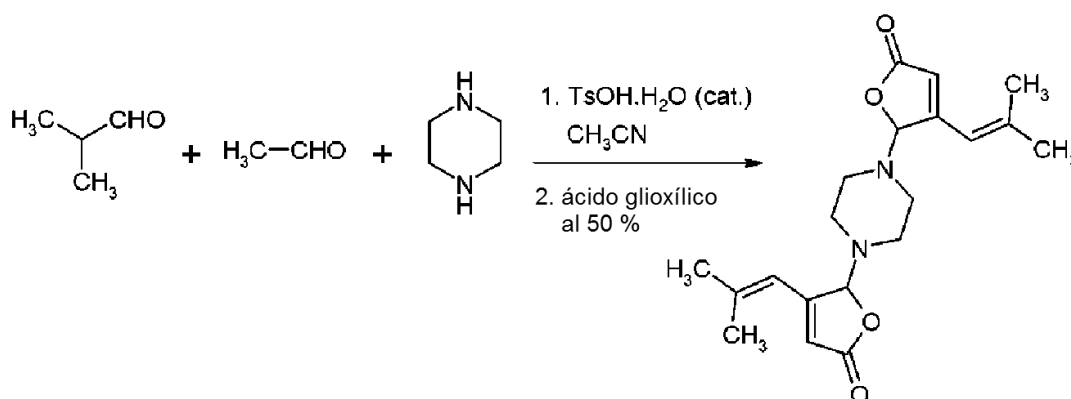
diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) pura (32,3 g, 60 %). Pudo obtenerse un 5 % adicional a partir de las aguas madres mediante una concentración.

RMN <sup>1</sup>H: δ 5,96 (d, 2H), 5,87 (d, 2H), 5,56 (m, 2H), 2,71 (s, 8H), 2,07 - 1,90 (m, 12H), RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 172,3 (C), 159,2 (C), 150,9 (C), 116,6 (CH), 115,4 (CH), 99,2 (CH), 46,7 (CH<sub>2</sub>), 28,2 (CH<sub>3</sub>), 21,4 (CH<sub>3</sub>).

- 5 Esta reacción también puede llevarse a cabo en isopropanol, en acetonitrilo-agua, en tolueno-agua o en heptano-agua, con unos rendimientos similares.

### Ejemplo 7

**Preparación de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) en un paso a partir de isobutiraldehído y acetaldehído.**



- 10 Se cargó ácido tósico (6,5 g, 0,03 mol) en una solución de piperazina (59 g, 0,69 mol) en acetonitrilo (240 ml). La reacción se calentó a 50 °C y se agitó hasta que se observó la disolución de los sólidos, antes de la adición de isobutiraldehído (138 ml, 1,51 mol). La reacción se mantuvo a 50 °C antes de cargar una solución de acetaldehído (60 ml; 1,07 mol) en acetonitrilo (30 ml) en el recipiente durante 3 h mediante una bomba de jeringa. Al completarse la adición, la reacción se agitó durante 30 minutos adicionales antes de añadir una solución al 50 % p/p de ácido glioxílico en agua (148 g, 1,0 mol) durante 5 min a la mezcla de reacción, seguido de agua (50 ml). La reacción se calentó después a 70 °C durante 2 h, después a 50 °C durante una noche. Después la reacción se enfrió hasta 5 °C y se mantuvo durante 30 minutos. La 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) precipitó y se aisló mediante una filtración y se lavó con acetonitrilo (2 x 100 ml) para dar el producto deseado (126 g, 93,5 % de ensayo, 66 % de rendimiento a partir de acetaldehído).
- 15
- 20

### Ejemplo 8

**Preparación exenta de disolvente de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona)**

- 25 Se cargó isobutiraldehído (79 g, 100 ml, 1,1 mol) en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos y se descargó argón abundantemente a través del sistema. La piperazina (43 g, 0,5 mol) y el TsOH-H<sub>2</sub>O (4,4 g; 0,023 mol) se dividieron en 4 porciones iguales que contienen piperazina (10,75 g) y TsOH-H<sub>2</sub>O (1,1 g). La adición de la primera porción de piperazina (10,75 g) dio como resultado una exotermia desde 24 °C hasta 35 °C. Esto estuvo seguido por la primera porción de TsOH (1,1 g). La reacción se agitó hasta que se disolvió toda la piperazina (t = 35 °C), tras lo cual se añadió la segunda porción de piperazina (10,75 g), seguida del TsOH (1,1 g) (t = 41 °C). La agitación se continuó hasta que se disolvió toda la piperazina (t = 41 °C), después se añadió la tercera porción de piperazina (10,75 g), seguida del TsOH (1,1 g). Después de la tercera carga se generó una solución clara, y después se añadieron la cuarta porción de piperazina (10,75 g) y de TsOH-H<sub>2</sub>O, seguidas del TsOH (1,1 g) (t = 52 °C). Al completarse la adición, la reacción se agitó a 50 °C durante 30 min.
- 30

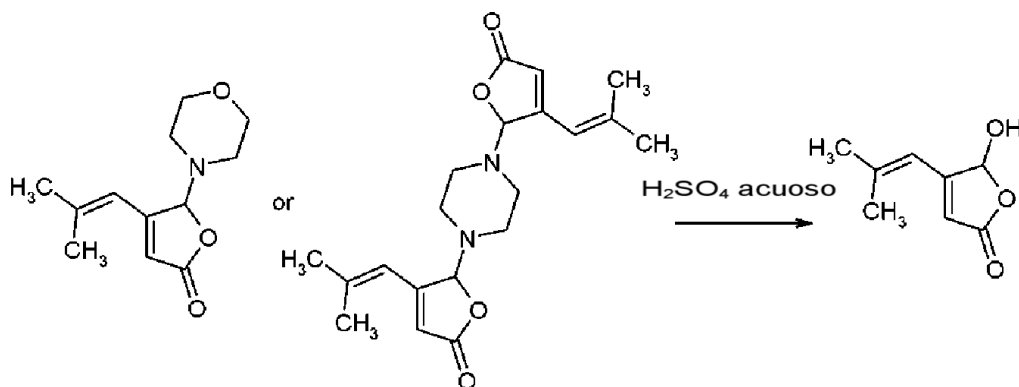
- 35 Se cargó otro matraz (50 ml) con acetaldehído (30,8 g, 39 ml, 0,7 mol) y se colocó en un baño de agua helada (0-2 °C). El matraz con el acetaldehído se conectó con el matraz de 3 cuellos mediante una cánula a través de un septo. Después se hizo pasar una corriente de argón a través del matraz de acetaldehído a una velocidad tal que asegurara que la adición del acetaldehído se completara en 3 h. Después de haber añadido todo el acetaldehído, la reacción se agitó durante 30 min a 50 °C, después se enfrió hasta 40 °C y se añadió ácido glioxílico al 50 % (104 g, 78 ml) gota a gota durante 45 min a una velocidad tal que se mantuviera la temperatura por debajo de 50 °C. Después se añadió agua (100 ml) y la reacción se calentó a 70 °C durante 5 h. La reacción se enfrió hasta 4 °C en un baño de agua helada. El producto precipitado se filtró y la torta del filtro se lavó con agua fría (100 ml). Después de secar a vacío a 50 °C se obtuvieron 88,9 g (71 %) del producto deseado. El precipitado contiene un 78,5 % del compuesto del título (HPLC de ensayo).
- 40

**Ejemplo 9****Preparación alternativa de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) con la adición simultánea de ambos aldehídos**

- 5 Se cargó piperazina (236,6 g) en un recipiente seco y limpio de 3 l equipado con un termómetro, un embudo de adición (100 ml) y un condensador a reflujo. Se cargó el pTsOH (25,3 g) en el recipiente, seguido del acetonitrilo (550 ml). Se puso en funcionamiento el agitador y el recipiente se inertizó con nitrógeno. Se cargó isobutiraldehído (150 ml, 27 % de la carga total) en la suspensión agitada de piperazina / pTsOH y se observó un aumento de la temperatura hasta aproximadamente 43 °C. Después, la suspensión de color blanco se calentó a 50 °C (+/- 5 °C). Se cargó una solución fría premezclada de isobutiraldehído (400 ml, 73 % de la carga total) y acetaldehído frío (260 ml) en un recipiente limpio y seco de 1 l, y esta mezcla se mantuvo en un baño de hielo. La mezcla de isobutiraldehído / acetaldehído se cargó en el contenido del recipiente de 3 l en alícuotas de 100 ml a lo largo de 5-6 h a 50 °C. El contenido del matraz de reacción cambió desde una suspensión de color blanco hacia una solución de color rojo vino, y finalmente una suspensión de color naranja durante la adición del acetaldehído. Después de completar la adición, la suspensión se agitó a 50 °C durante entre aproximadamente 0,5 y 1,0 h.
- 15 Se cargó una solución acuosa de ácido glioxílico (al 50 % p/p) en la suspensión durante 10-15 min y la temperatura se elevó hasta aproximadamente 75 °C. Se observó que la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) cristalizaba en la solución. La suspensión se agitó a 70 °C (+/- 5 °C) durante 6 h, después se enfrió con agitación hasta la temperatura ambiente. Después el lote se enfrió hasta entre -5 y 0 °C durante y se mantuvo durante 3-4 h antes de filtrar la suspensión, y la torta del filtro se lavó con metanol frío (1 x 500 ml), después con 2 x 500 ml de metanol a la temperatura ambiente. El producto lavado se secó en un horno de vacío a 40-50 °C hasta peso constante para proporcionar 474 g de un 98 % de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) pura (70 %).

**Ejemplo 10**

- 25 **Preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona a partir de la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-2(5H)-furanona o de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona).**



- 30 Se cargó una solución acuosa de ácido sulfúrico al 10 % p/p (110 g) en la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-2(5H)-furanona (20,0 g, 0,896 mol) y la mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 4 h o hasta que la TLC (100:3 de CPME:HOAc) indicó que se había completado la reacción. La mezcla permaneció en suspensión todo el tiempo. Después se enfrió hasta 5 °C, se mantuvo durante 2 h y se filtró. El sólido de color blanco se lavó con agua y se secó para proporcionar la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona (12,9 g, 93 %).

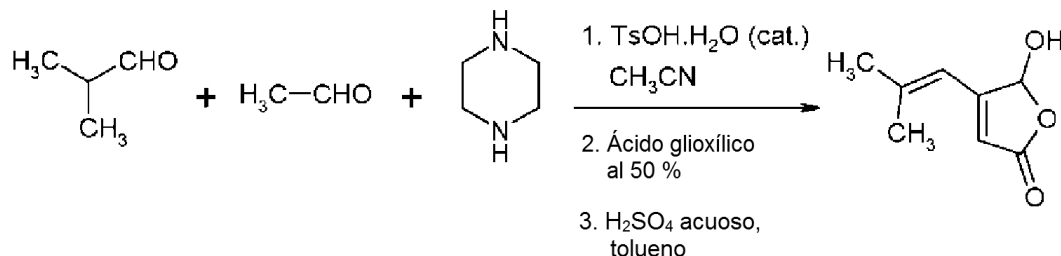
- 35 Alternativamente, se cargó una solución acuosa de ácido sulfúrico al 10 % p/p (412 g) en un recipiente que contenía 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) (60 g, 0,167 mol). El contenido se agitó y después se calentó a reflujo. La reacción se mantuvo a reflujo hasta que se hubo consumido el material de partida, lo que fue determinado mediante disolución. Al completarse la reacción, el lote se enfrió hasta 35 °C, punto en el cual el compuesto objetivo comenzó a cristalizar. La suspensión se enfrió adicionalmente hasta 0-5 °C y después se transfirió a un filtro. El producto se filtró, se lavó con agua (2 x 100 ml) y después se secó a vacío a < 50 °C, para dar la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona (42,0 g, 81 %).

- 40 CG/EM: m/z = 154  
 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,10 (s, 1 H); 5,92 (s, 1 H); 5,88 (s, 1 H); 5,35 (s a, 1 H, O-H); 1,98 (s, 3H); 1,93 (s, 3H), RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 172,8 (C), 161,4 (C), 152,3 (C), 115,3 (CH), 114,9 (CH), 99,5 (CH), 28,2 (CH<sub>3</sub>), 21,4 (CH<sub>3</sub>).



**Ejemplo 11**

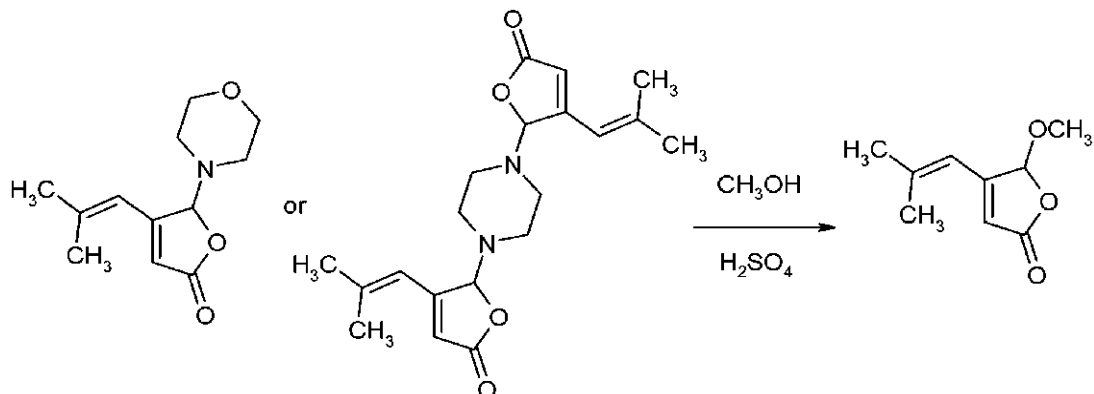
**Preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona en un paso a partir de isobutiraldehído y acetaldehído.**



- 5 Se calentó una mezcla de piperazina (43,0 g, 0,5 mol) e isobutiraldehído (200 ml) a reflujo en Dean-Stark hasta que se recogió la cantidad teórica de agua (18 ml). El exceso de isobutiraldehído se eliminó mediante una destilación para dejar una masa cristalina de 1,4 bis(2-metilpropen-1-il) piperazina. Esta se disolvió en acetonitrilo (1,2 l) y se añadió isobutiraldehído (100 ml, 1,0 mol) adicional. Se añadió piperazina (4,4 g) adicional, seguido de ácido p-toluensulfónico (4,4 g, 23,2 m mol). La temperatura se ajustó a 40 °C y se añadió una solución de acetaldehído (44 g, 1,0 mol) en acetonitrilo (40 ml) durante 4 h. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 1 h y a la temperatura ambiente durante 4 h. El acetonitrilo se eliminó mediante una destilación y el residuo se suspendió en tolueno (400 ml). Se añadió una mezcla de ácido glioxílico al 50 % (148 g) y agua (150 ml) durante 0,5 h. Después la mezcla se agitó a 45 °C durante 15 h. Había un precipitado sólido. Se añadió ácido sulfúrico diluido (al 10 %, 1 l) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. Se formó una mezcla bifásica. Se separó la fase del tolueno. Contenía aproximadamente un 50 % de rendimiento (basado en acetaldehído) de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropen-1-il)-2-furanona mediante un análisis

**Ejemplo 12**

**Preparación de la 5-metoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona**



- 20 Se agitó 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-2(5H)-furanona (7,70 g, 34,5 m mol) en MeOH (50 ml) con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 ml, 2,2 eq) a reflujo durante 3 h hasta la desaparición del material de partida mediante una CG. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente. Después se evaporó el disolvente a vacío y el residuo se diluyó con EtOAc (50 ml). La fase orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (3 x 50 ml). Después, el disolvente se evaporó a vacío para dar la 5-metoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona en forma de un aceite de color naranja (5,50 g, 95 %) que puede ser usada sin purificación.

- Alternativamente, se cargó 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) (130 g, 363 m mol) y MeOH (690 ml) en un matraz de fondo redondo de 2 l con agitación mecánica para formar una suspensión. Se añadió gota a gota H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (43 ml, 762 m mol) con agitación a 20-25 °C – se observó una ligera exotermia y la naturaleza de los sólidos presentes se modificó desde dispersada y fácilmente mezclada hacia una suspensión más gruesa. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5 h. Después de 0,5 h se observó una completa disolución (líquido de color naranja). Después de 5 h la CLEM mostró un ~ 99 % del producto deseado. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se dejó para la cristalización del sulfato de piperazina. Los sedimentos se filtraron y la torta del filtro se lavó con MeOH enfriado en hielo (400 ml). El filtrado se concentró a vacío (temperatura del baño de 40 °C), y el residuo se particionó entre agua (50 ml) y MTBE (300 ml). Se separó la capa acuosa y se extrajo adicionalmente (2 x 300 ml de MTBE). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (200 ml). La capa de MTBE se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con agitación durante 1,5 h, se filtró y

se evaporó para dar la 5-metoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona en forma de un aceite de color naranja (120 g, 98 %).

Destilado a 0,2-0,3 mbar de vacío con un p. eb. de 100-105 °C. CG/EM: m/z = 168; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,59 (1H, s) 5,88 - 5,86 (1 H, m) 5,75 (1H, d, J = 0,6) 3,53 (3H, s) 2,01 - 2,00 (3H, m) 1,97 - 1,96 (3H, m), RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 171,4 (C), 159,2 (C), 151,9 (C), 115,8 (CH), 115,2 (CH), 104,4 (CH), 56,1 (CH<sub>3</sub>), 28,2 (CH<sub>3</sub>), 21,4 (CH<sub>3</sub>).

Los siguientes compuestos se prepararon a partir de la 4-(2-metil-1-propenil)-5-morfolin-2(5H)-furanona según el primero de los procedimientos anteriores mediante la sustitución del metanol por 3-metilbutanol (alcohol isoamílico), n-pentanol (alcohol amílico) o n-butanol:

#### Ejemplo 12A

#### 10 5-(3-Metilbutoxi)-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona

Destilado a 0,4 mbar de vacío con un p. eb. de 139-140 °C; CG/EM: m/z = 224; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,94 (1 H, s) 5,87 - 5,84 (1 H, m) 5,80 (1 H, s) 3,86 - 3,80 (1H, m) 3,70 - 3,64 (1 H, m) 2,00 (3H, s) 1,96 (3H, s) 1,77 - 1,66 (1 H, m) 1,57 - 1,50 (2H, m) 0,93 - 0,91 (3H, m) 0,91 - 0,89 (3H, m)

#### Ejemplo 12B

#### 15 4-(2-Metilprop-1-en-1-il)-5-pentiloxifuran-2(5H)-ona

Destilado a 0,08 mbar de vacío con un p. eb. de 123-134 °C; CG/EM: m/z = 224; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,94 (s, 1 H); 5,86 (s, 1 H); 5,80 (s, 1 H); 3,84 - 3,75 (m, 1 H); 3,68 - 3,59 (m, 1H); 2,01 (s, 3H); 1,95 (s, 3H); 1,69 - 1,59 (m, 2H); 1,38 - 1,29 (m, 4H); 0,95 - 0,85 (m, 3H)

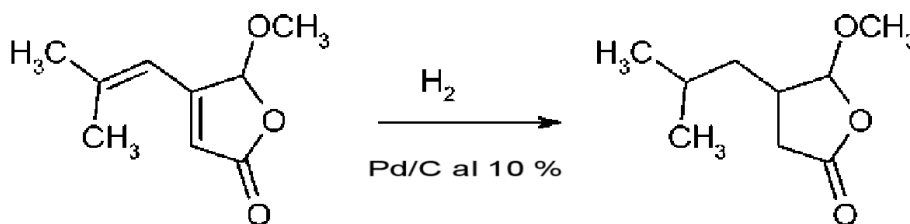
#### Ejemplo 12C

#### 20 5-Butoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona

Destilado a 0,05 mbar de vacío con un p. eb. de 136-146 °C; CG/EM: m/z = 210; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,94 (s, 1 H); 5,86 (s, 1 H); 5,80 (s, 1 H); 3,85 - 3,76 (m, 1 H); 3,69 - 3,60 (m, 1H); 2,00 (s, 3H); 1,95 (s, 3H); 1,68 - 1,58 (m, 2H); 1,45 - 1,32 (m, 2H); 0,93 (t, 3H, J = 7,4 Hz)

#### Ejemplo 13

#### 25 Preparación de la 5-metoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona



Se cargó una solución de 5-metoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona (100 g, véase el ejemplo 12) en MTBE (700 ml), 5 g (5 % en peso) de Pd/C al 10 % en un recipiente de hidrogenación. Se introdujo 1 atm de hidrógeno gaseoso y la presión se mantuvo constante durante la reacción. Después de 7 h a 20 °C, la reacción se filtró a través de una capa de celita (∅ de 60 mm, H = 30 mm) y se aclaró con MTBE (3 x 50 ml). El filtrado se lavó con una solución de NaHCO<sub>3</sub> 1 M (200 ml), agua y salmuera, y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la eliminación del disolvente, se obtuvo la 5-metoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona en forma de un líquido incoloro (98 g, 96 %).

CG/EM: m/z = 172

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,25 (d, J = 5,0 Hz, 0,53 H, isómero mayor), 5,04 (d, J = 2,4 Hz, 0,26H, isómero menor), 3,48 (s, 0,92H, isómero menor), 3,46 (s, 1,66H, isómero mayor), 2,78 (dd, J = 17,7, 8,6 Hz, 0,33H), 2,59 - 2,42 (m, 1,27H, isómero mayor), 2,42 - 2,34 (m, 0,33H, isómero menor), 2,29 (dd, J = 16,7, 11,8 Hz, 0,63H, isómero mayor), 2,15 (dd, J = 17,7, 4,6 Hz, 0,33H, isómero menor), 1,67 - 1,31 (m, 2,63H ambos isómeros), 1,28 - 1,19 (m, 0,33H, isómero menor), 0,95 - 0,86 (m, 6H ambos isómeros), RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 177,7 (C, isómero mayor), 176,04 (C, isómero menor), 110,1 (CH, isómero menor), 106,1 (CH, isómero mayor), 57,0 (CH<sub>3</sub>, isómero menor), 56,6 (CH<sub>3</sub>, isómero mayor), 41,2 (CH<sub>3</sub>, isómero menor), 39,1 (CH<sub>3</sub>, isómero menor), 38,3 (CH<sub>3</sub>, isómero mayor), 37,1 (CH<sub>3</sub>, isómero mayor), 33,9 (CH, isómero menor), 32,8 (CH, isómero mayor), 26,0 (CH, isómero mayor), 25,8 (CH, isómero menor), 23,0 (CH<sub>3</sub>, isómero mayor), 22,9 (isómero menor), 22,7 (isómero mayor), 22,6 (isómero menor).

Utilizandol mismo procedimiento general, y partiendo de los compuestos de los ejemplos 12A, 12B y 12C respectivamente, también se obtuvieron los siguientes compuestos:

### Ejemplo 13A

#### 5-(3-Metilbutoxi)-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona

- 5 CG/EM:  $m/z = 228$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (0,86H, d,  $J = 5,0$  Hz) 5,13 (0,14H, d,  $J = 2,7$  Hz) 3,87 - 3,79 (m, 1H) 3,57 - 3,45 (m, 1H) 2,58 - 2,37 (2H, m) 2,35 - 2,27 (0,79H, m) 2,20 - 2,11 (0,21H, m) 1,74 - 1,62 (1H, m) 1,61 - 1,44 (4H, m) 1,42 - 1,31 (1 H, m) 0,95 - 0,86 (12H, m)

### Ejemplo 13B

#### 4-(2-Metilpropil)-5-pentiloxidihidrofuran-2(3H)-ona

- 10 CG/EM:  $m/z = 228$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (0,77H, d,  $J = 5,0$  Hz) 5,13 (0,23H, d,  $J = 2,6$  Hz,) 3,83 - 3,75 (1 H, m) 3,55 - 3,40 (1 H, m) 2,59 - 2,37 (2H, m) 2,32 (0,73H, dd,  $J = 16,6, 11,8$  Hz) 2,15 (0,27H, dd,  $J = 17,7, 5,0$  Hz) 1,67 - 1,45 (4H, m) 1,41 - 1,25 (5H, m) 0,96 - 0,86 (9H, m)

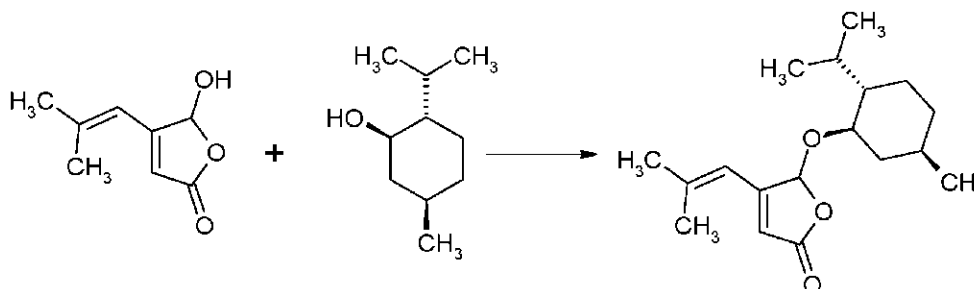
### Ejemplo 13C

#### 5-Butoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona

- 15 CG/EM:  $m/z = 214$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (0,8H, d,  $J = 5,0$  Hz) 5,13 (0,2H, d,  $J = 2,6$  Hz,) 3,85 - 3,75 (1 H, m) 3,56 - 3,41 (1 H, m) 2,59 - 2,38 (2H, m) 2,31 (0,76H, dd,  $J = 16,5, 11,7$  Hz) 2,15 (0,24H, dd,  $J = 17,6, 5,0$  Hz) 1,66 - 1,45 (4H, m) 1,43 - 1,30 (3H, m) 0,95 - 0,87 (9H, m)

### Ejemplo 14

#### Preparación e hidrogenación de la 5-(L-mentiloxi)-4-(2-metil-1-propenil)-2(5H)-furanona

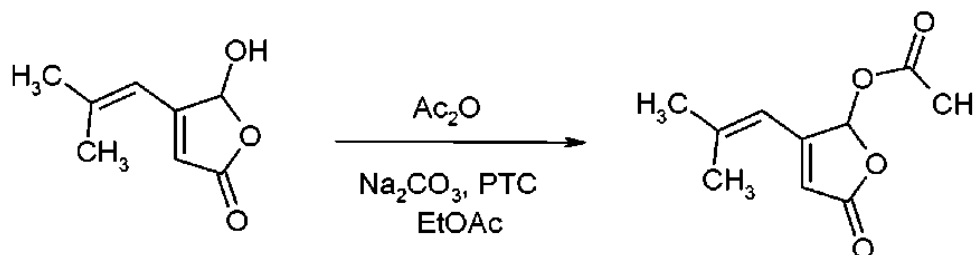


- 20 Se agitó una mezcla de 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-2-furanona (59,5 g, 0,386 mol), L-mentol (89,5 g, 1,5 equivalentes) y ácido metansulfónico (1,5 g) a 70-80 °C a vacío (para eliminar el agua) durante 100 h. La masa líquida se vertió (en caliente) en acetonitrilo (450 ml) y el compuesto del título se aisló mediante un enfriamiento, una filtración y un lavado. El rendimiento fue de 76,2 g (67 %). Los cristales adecuados para la XRD crecieron mediante una evaporación lenta de una solución de acetona. La configuración en el carbono acetal era (R).
- 25

La hidrogenación de la 5-(L-mentiloxi)-4-(2-metil-1-propenil)-2-furanona en acetato de etilo utilizando las condiciones del Ejemplo 13, proporcionó el derivado saturado con un rendimiento cuantitativo. Mediante una RMN  $^1\text{H}$ , el compuesto era una mezcla 1:1 de diastereómeros.

### Ejemplo 15

- 30 **Preparación de la 5-acetoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona**



Se trató una suspensión de 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona (19 g, 0,123 mol) en acetato de etilo (100 ml) con carbonato de sodio sólido (13,1 g, 0,123 mol) e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (0,5 g). Se añadió anhídrido acético (18,8 g, 1,5 eq) en una porción. Se produjo una reacción moderadamente exotérmica. La mezcla

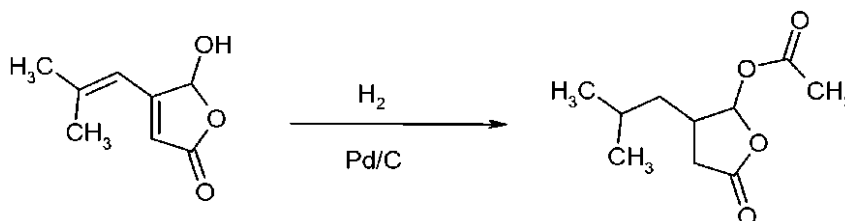
se agitó durante una noche, se añadió agua (100 ml) y la fase orgánica se separó (el pH de la fase acuosa era de 6,0). La fase del acetato de etilo se lavó con agua y se concentró hasta dejar un sólido (24,6 g, 100 %). Este era puro mediante una TLC (100:3 de CPME:ácido acético). Si esta reacción se lleva a cabo en acetato de isopropilo, puede aislarse el compuesto puro mediante el enfriamiento de la solución de acetato de isopropilo después del lavado con agua con un rendimiento de aproximadamente el 70 %.

5

m/z: 196

### Ejemplo 16

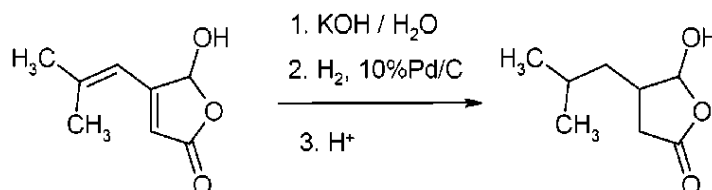
#### Hydrogenación de la 5-acetoxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona



10 El material del ejemplo 34 se hidrogenó en unas condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 13 para dar un rendimiento > 90 % de la 5-acetoxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-2(5H)-furanona en forma de una mezcla 1:1 de diastereómeros. El producto está acompañado por aproximadamente un 5 % de 4-(2-metilpropil)-3,4-dihidrofuran-2(5H)-ona. El producto puede ser hidrolizado como en el Ejemplo 30 para dar unos rendimientos de 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona / ácido 3-formil-5-metilhexanoico.

### 15 Ejemplo 17

#### Preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)dihidrofuran-2(3H)-ona (I<sup>A</sup>) mediante una hidrogenación de la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona en una solución alcalina



20 Se cargaron 5-hidroxi-4-(2-metilpropen-1-il)-2-furanona (3,35 g, 21,7 m mol) y agua (20 ml) en un hidrogenador, después se cargó hidróxido de potasio (1,21 g, 1 eq) en el recipiente y el contenido se calentó a 40 °C hasta que se produjo la disolución. Se cargó un catalizador de Pd/carbono al 10 % (0,67 g) en el recipiente y el contenido del reactor se hidrogenó después a 40 °C y 5 barg de presión de hidrógeno. Al completarse la reacción, la reacción se enfrió y el catalizador se eliminó mediante una filtración. El pH se ajustó a pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico al 36 % y la capa acuosa se lavó con tolueno para extraer el producto deseado. Los extractos de tolueno  
25 combinados se concentraron para dar el compuesto del título (3,17 g, 92 %).

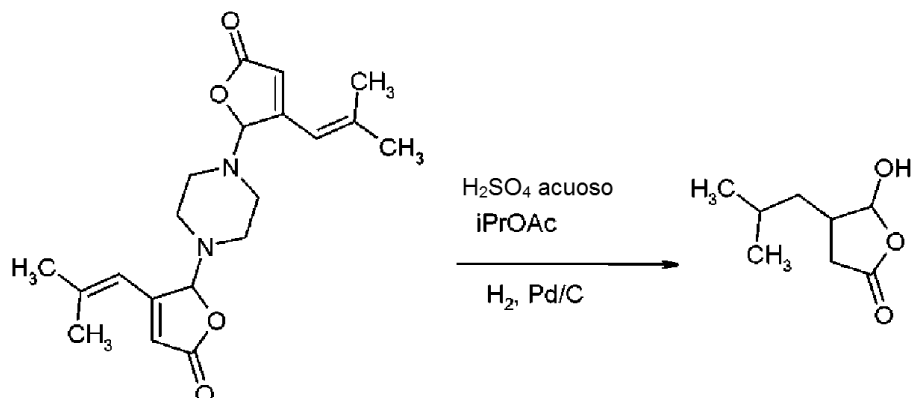
### Ejemplo 18

#### Hydrogenación de la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona en una solución neutra

30 Se hidrogenó 5-hidroxi-4-(2-metilpropen-1-il)-2-furanona en 6 ml de agua por gramo de material de partida con un catalizador de un 10 % p/p de Pd/C (22 h, 40 °C, 10 bar). Durante la filtración se separó una fase oleosa del agua. Esta era una mezcla 1:1 de 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)dihidrofuran-2(3H)-ona (I<sup>A</sup>) y 4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2-ona. El compuesto (I<sup>A</sup>) puede ser fácilmente separado puro mediante una extracción ácido base. Esta reacción se repitió en disolventes orgánicos, proporcionando el 2-propanol el (I<sup>A</sup>) relativamente puro.

## Ejemplo 19

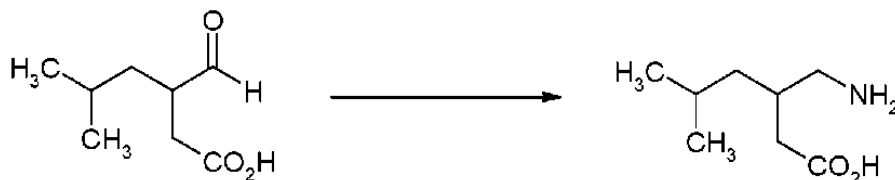
Preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)dihidrofuran-2(3H)-ona (I<sup>A</sup>) a partir de la 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) en un paso



- 5 Se cargó 5,5'-(piperazin-1,4-diil)bis(4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona) (50,0 g, 0,14 mol) en agua (300 ml) que contiene ácido sulfúrico (16,0 g, 0,163 mol). Se añadió acetato de isopropilo (200 ml). Se añadió paladio sobre carbono al 5 % humedecido con un 50 % de agua (3,0 g) y la mezcla se hidrogenó (5 bar de hidrógeno) a la temperatura ambiente durante 15 h. La mezcla de reacción se filtró del catalizador, se lavó con acetato de isopropilo (300 ml) – esto también se usó para lavar el recipiente. La fase orgánica se separó, se lavó con agua (100 ml) y se
- 10 concentró en un rotavapor para proporcionar 38,8 g de un aceite claro. Este era una mezcla del compuesto deseado (I<sup>A</sup>) y la lactona sobrerreducida (4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2-ona). Se purificó fácilmente mediante una extracción con una solución acuosa de carbonato de potasio y se lavó con tolueno. La acidificación del extracto de carbonato de potasio con ácido fórmico proporcionó el producto deseado (I<sup>A</sup>) (25,6 g, 58 %). RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O con la adición de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). δ 9,5 (1 H), 2,8 (m, 2H), 2,40 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 0,95 (m, 6H).

## 15 Ejemplo 20

Biotransformación del ácido 3-formil-5-metilhexanoico en pregabalina con ω-transaminasas recombinantes



- La transaminación del ácido 3-formil-5-metilhexanoico para formar la pregabalina fue evaluada con varias transaminasas recombinantes. Las ω-transaminasas recombinantes de *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Paracoccus denitrificans* fueron expresadas en *E. coli* como sigue: se transformaron las construcciones de expresión de la ω-transaminasa pET28b en *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) según se indica, y los cultivos de una noche se cultivaron en medio LB + kanamicina. Los cultivos de LB se usaron para inocular cultivos de expresión cultivados en medio Overnight Express Instant TB + kanamicina (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, EE.UU.). Los cultivos se incubaron durante 20 h a 30 °C y las células fueron recogidas
- 20 mediante una centrifugación (4.000 x g, 30 min, 4 °C) y almacenadas a -20 °C.

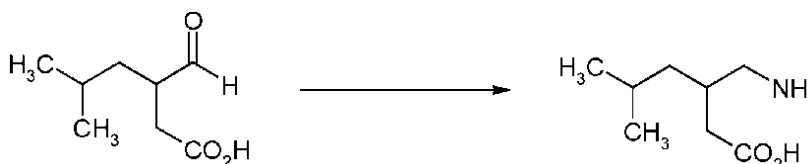
- Las reacciones (0,5 ml) se llevaron a cabo a 30 °C en tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH 7,0), fosfato de piridoxal (2 mM), isopropilamina (150 mM), ácido 3-formil-5-metilhexanoico (50 mM) y ω-transaminasa (40 mg de células húmedas/ml) de *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides* o *Paracoccus denitrificans*. Después de 24 h, las muestras de reacción (0,1 ml) se diluyeron con 0,4 ml de acetonitrilo:agua (1:1, v/v). Se trataron alícuotas (0,05 ml) de las muestras de reacción diluidas con bicarbonato de sodio acuoso saturado (0,01 ml) y reactivo de Marfey (N-α-(2,4-dinitro-5-fluorofenil) alaninamida, 0,2 ml de una solución de 5 g/l en acetonitrilo) a 40 °C. Después de 1 h, las reacciones de derivatización se inactivaron con 0,01 ml de ácido clorhídrico acuoso 1 N y se diluyeron con 0,23 ml de acetonitrilo. Las muestras de reacción derivatizadas se analizaron mediante una UPLC (columna: BEH C18, de 50 mm x 2,1 mm de d.i., elución en gradiente: desde un 70 % de A:30 % de B hasta un 55 % de A:45 % de B en 5
- 30 min (A = trietilamina al 1 % (pH 3 con ácido fosfórico); B = acetonitrilo), caudal: 0,8 ml/min, temperatura de la columna: 30 °C, detección: 210-400 nm) para dar los resultados mostrados en la Tabla 5.

- 35

Tabla 5

Entrada	Enzima	Número de registro	% de rendimiento de pregabalina	% de ee de la (S)-pregabalina
1	$\omega$ -transaminasa de <i>Vibrio fluvialis</i>	AEA39183	37,5	60,6
2	$\omega$ -transaminasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	YP_001043908	24	84,4
3	$\omega$ -transaminasa de <i>Paracoccus denitrificans</i>	YP_917746	44	60,6

## Ejemplo 21

Biotransformación del ácido 3-formil-5-metilhexanoico en pregabalina con  $\omega$ -transaminasas recombinantes

5 Se ensayaron variantes recombinantes de *Vibrio fluvialis* para evaluar la aminación reductora del ácido 3-formil-5-metilhexanoico para formar pregabalina. Se expresaron variantes de la  $\omega$ -transaminasa de *V. fluvialis* (número de registro AEA39183) en *E. coli* como sigue: se usaron kits de mutagénesis dirigida QuikChange de Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.) para crear variantes de la aminotransferasa de *V. fluvialis* según se indica. Los cebadores se pidieron a Integrated DNA Technologies (Coralville, LA, EE.UU.). Las construcciones de expresión de la  $\omega$ -transaminasa de pET28b fueron transformadas en *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) según se indica, y los cultivos de una noche se cultivaron en medio LB + kanamicina. Los cultivos de LB se usaron para inocular cultivos de expresión cultivados en medio Overnight Express Instant TB + kanamicina (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, EE.UU.). Los cultivos se incubaron durante 20 h a 30 °C y las células fueron recogidas mediante una centrifugación (4.000 x g, 30 min, 4 °C) y almacenadas a -20 °C.

10 Las reacciones (0,5 ml) se llevaron a cabo a 30 °C en tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH 7,0), fosfato de piridoxal (2 mM), isopropilamina (300 mM), ácido 3-formil-5-metilhexanoico (100 mM) y  $\omega$ -transaminasa de *V. fluvialis* naturales o variantes (40 mg de células húmedas/ml). Después de 28 h, las muestras de reacción (0,1 ml) se diluyeron con 0,4 ml de acetonitrilo:agua (1:1, v/v). Se trataron alícuotas (0,05 ml) de las muestras de reacción diluidas con bicarbonato de sodio acuoso saturado (0,01 ml) y reactivo de Marfey (N- $\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil) alaninamida, 0,2 ml de una solución de 5 g/l en acetonitrilo) a 40 °C. Después de 1 h, las reacciones de derivatización se inactivaron con 0,01 ml de ácido clorhídrico acuoso 1 N y se diluyeron con 0,23 ml de acetonitrilo. Las muestras de reacción derivatizadas se analizaron mediante una UPLC (columna: BEH C18, de 50 mm x 2,1 mm de d.i., elución en gradiente: desde un 70 % de A:30 % de B hasta un 55 % de A:45 % de B en 5 min (A = trietilamina al 1 % (pH 3 con ácido fosfórico); B = acetonitrilo), caudal: 0,8 ml/min, temperatura de la columna: 30 °C, detección: 210-400 nm) para dar los resultados mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6

Entrada	Variante de la $\omega$ -transaminasa de <i>V. fluvialis</i>	% de conversión	% de ee
1	W57F/K163L/R415F	6,1	81,1
2	Y165F	9,5	75,3
3	W147N	10,0	75,0
4	A228G	32,3	74,9
5	N166V	16,6	74,5
6	W57F/A228G	33,3	73,9
7	V156M	13,2	70,3
8	S159A	7,9	70,2
9	W57F/R415F	10,7	68,5
10	R415F	11,8	68,1
11	M59N	10,1	68,0
12	P301K	19,1	67,6
13	Y113F	7,9	65,2

## ES 2 630 128 T3

(continuación)

Entrada	Variante de la $\omega$ -transaminasa de <i>V. fluvialis</i>	% de conversión	% de ee
14	F86G	32,1	64,1
15	I254V	32,1	64,0
16	H326N	15,9	63,8
17	C414I	10,1	63,0
18	W57F/K163L/V153A	46,1	41,2
19	W57F/K163L	43,5	36,1
20	D21Y	45,1	34,2
21	W57F/D21Y	46,3	34,0
22	M294V	42,4	33,2
23	W57F/M294V	41,2	32,5
24	W57F/V177I	39,9	29,0
25 <sup>1</sup>	Vat 565	20,0	90,5
26 <sup>1</sup>	Vfat665	15,0	93,1
271	Vfat701	9,0	94,4
281	Vfat707	7,5	95,7
291	Vfat747	50,0	97,5
301	Vfat825	75,0	95,7
311	Vfat 850	81,3	94,6
321	Vfat 875	80,5	95,1
331	Vfat888 <sup>2</sup>	95,0	95,5

Nota - 1: entrada 25 hasta la 33 – las reacciones se llevaron a cabo utilizando ácido 3-formil-5-metilhexanoico 400 mM, PLP 3 mM, IPM 800 mM a 45 °C,  
2: Vfat 888:

SECUENCIA DE ADN

ATGAATAAACCAACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCTCTGTAC  
GGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCACCAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACC  
CACGGCGAGGGCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGA  
CGCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCT  
GATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAACGCTTCCC GGTTACCATAGCTT  
CTTCGGTTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGA  
GGTGTCTCCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGA  
GGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGG  
CAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTAACAACGCATACCACGGTGT  
AACTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTCTGTATTCGG  
CCTGCCGCTGCCGGGTTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTA  
CGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGCG  
AGCTGGAGGAAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTC  
TTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAG  
GTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTA  
TCTCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTG  
CGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACC  
GCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACTGGCGAAA  
CGCCTGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTAC  
GGCCAGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCTGAAAGCAATCGATG  
TTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGT  
TTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATAT  
CGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAAGCATCT  
AAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCGAGCGTATCGCTAACACCT  
GTACCGACCTGGGCCTGATCTGTAGCCCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGT  
GCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAAC

--

TGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO.  
10)

**SECUENCIA DE AMINOÁCIDO**



MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVWTHGEGPYIVDVNGRRYLDA  
 NSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVS  
 PFDSEGRVFTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTAV  
 SASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETI  
 QREGADTIAGFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRT  
 GNTWGCVTYDFTPDAIISSKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLETAIEAIEEFPHG  
 TASGHPVGCALKAIDVVMNEGLAENVRRLAPRFEERLKHIAERPNIIGEYRGIG  
 FMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTE  
 AQMDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 2)

**Ejemplo 22**

**Variantes alternativas de la  $\omega$ -transaminasa de *Vibrio fluvialis***

5 Se expresaron las siguientes variantes recombinantes adicionales de la  $\omega$ -transaminasa de *Vibrio fluvialis* en *E. coli*  
 BL21(DE3) (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) según se indica y los cultivos de una noche  
 se cultivaron en medio LB + kanamicina. Los cultivos de LB se usaron para inocular cultivos de expresión cultivados  
 en medio Overnight Express Instant TB + kanamicina (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, EE.UU.). Los  
 10 cultivos se incubaron durante 20 h a 30 °C y las células fueron recogidas mediante una centrifugación (4.000 x g, 30  
 min, 4 °C) y almacenadas a -20 °C.

**Ejemplo 22a: Vfat906**

Secuencia de ADN:

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
 CACTGATATGCCATCTCTGCACgAGCGTGTTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAG  
 GGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGCC  
 TGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGC  
 CCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAA  
 CTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTGCGCT  
 GTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGGT  
 TTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGT<sup>aac</sup>AAC  
 GCATACCACGGTGTAACTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTC  
 TGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATTGG  
 CGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCG  
 AGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGC  
 TGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCA

GGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTA  
TCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACC  
CCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTCCGGTTGGTG  
CTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTAT  
CGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCggcGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATC  
GCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCC  
GCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACAT  
CGGTGAATATCGTGGCATCGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAA  
GCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCaaaCGTATCGCTAACACC  
TGTcagGACCTGGGCCTGATCTGTAGCgCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGTGCC  
GCCGTTATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAACTGGAGAAG  
GCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 11)

Secuencia de aminoácidos:

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVHGRRYLDANGLY  
NMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFT  
NSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFGL  
PLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAG  
GVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAG  
FFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVR  
RLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQD  
LGLICSAMGQSVILSPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 7)

**Ejemplo 22b: Vfat999**

5 Secuencia de ADN:

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
GGCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGC  
CTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGG  
CCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAA  
ACTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTGACAGCGGTCCGCG  
TGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGG  
TTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAA  
ACGCATACCACGGTGTAACCTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAA  
CTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATT

GGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG  
 CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTT  
 GCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTC  
 CAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGT  
 TATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCA  
 CCCCCGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
 GCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAACGGCGATCGAAGCTA  
 TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTA  
 TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
 CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
 ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
 AAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
 ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGA  
 GCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
 GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 12)

Secuencia de aminoácidos

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTWVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANGL  
 YNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVY  
 TNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFG  
 LPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGA  
 GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTA  
 GFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENV  
 RRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRIGIFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQ  
 DLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 4)

**Ejemplo 22c: Vfat1010**

5 Secuencia de ADN:

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
 CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
 GGCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCCCGTTACCTGGACGCAAACTCCGGCC  
 TGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGC  
 CCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAA  
 CTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTCGCGT  
 GTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGGT

TTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAATCCTGACTCGTCAAAA  
 CGCATAACCACGGTGTAACTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTATGCCGCACAAC  
 TCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATTG  
 GCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGC  
 GAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTG  
 CTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCC  
 AGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTT  
 ATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCAC  
 CCCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
 GCTGTGATTCTGGGTCCGGCACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
 TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTGCGCTA  
 TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
 CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
 ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
 AAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
 ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGA  
 GCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
 GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 13)

Secuencia de aminoácidos

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVWTHGEGPYIVDVNGRRYLDANGLY  
 NMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYT  
 NSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGMPHNSVFG  
 LPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGA  
 GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTA  
 GFFPVGAVILGPALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENV  
 RRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQ  
 DLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 5)

**Ejemplo 22d: Vfat1020**

5 Secuencia de ADN:

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
 CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
 GGCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGC  
 CTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGG

CCCAGTACGAACGCTTCCC GGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAA  
 ACTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTTCGACAGCGGTCGCG  
 TGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGG  
 TTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAA  
 ACGCATACCACGGTGTAAGTGTGTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAA  
 CTCTGTATTCCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGGGTTGTCCGCACTATT  
 GCGGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCG  
 CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTT  
 GCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTC  
 CAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGT  
 TATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCA  
 CCCC GGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
 GCTGTGATTCTGGGTCCGGAAGTGAAGCAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
 TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTA  
 TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
 CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
 ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
 AAGCATCTAAAACCCATTTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
 ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTTCAGTCCGTTATCCTGA  
 GCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
 GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 14)

Secuencia de aminoácidos

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMP SLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANGL  
 YNMVAGFDHKGLIDA AKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVfy  
 TNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFG  
 LPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGA  
 GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIIS SKNLTA  
 GFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENV  
 RRLAPRFEERLKHIAERP NIGEYRIGIFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQ  
 DLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMD E MFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 6)

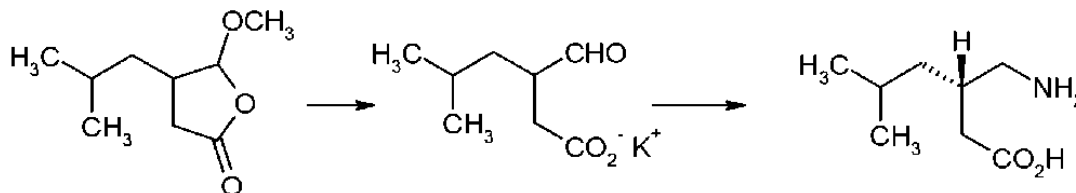
**Ejemplo 22e: Vfat1030**

5 Secuencia de ADN:

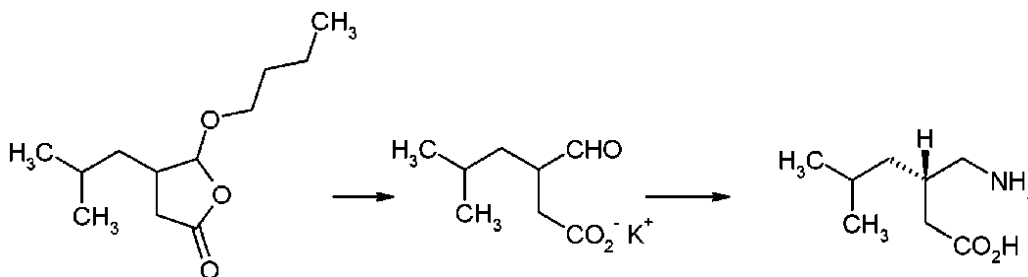
ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
 CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
 GGCCATACATCGTGGACGTCCACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGC  
 CTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGG  
 CCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAA  
 ACTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTCCGG  
 TGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGG  
 TTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAA  
 ACGCATAACCACGGTGTAAGTCTGTTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAA  
 CTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGAGCTGTCCGCACTATT  
 GGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG  
 CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTT  
 GCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTC  
 CAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGT  
 TATCTGCGGCTTTGGTTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCA  
 CCCC GGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
 GCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
 TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTA  
 TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
 CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
 ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
 AAGCATCTAAAACCCATTGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
 ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGA  
 GCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
 GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO. 15)

Secuencia de aminoácidos

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVTHGEGPYIVDVHGRRYLDANGLY  
 NMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYT  
 NSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFGL  
 PLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAG  
 GVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAG  
 FFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCALKAIDVVMNEGLAENVR  
 RLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQD  
 LGLICSAMGQSVILSPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO. 7)

**Ejemplo 23****Preparación de (S)-pregabalina a través de una hidrólisis de la 5-metoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona y una transaminación enzimática**

- 5 Se suspendió la 5-metoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona (2,58 g, 15 mmol, véase el ejemplo 13) en DIW (5,2 g) y se enfrió en un baño de hielo/agua. Se añadió KOH acuoso (50 % p/p, 1,77 g, 1,05 eq) gota a gota mediante una jeringa durante 5 min. La reacción se retiró del baño de hielo/agua y se agitó a la ta durante 90 min. El pH se ajustó a 7,0 utilizando ácido fórmico. La mezcla de reacción se usó después como materia prima en la subsiguiente reacción de la transaminasa.
- 10 Se cargaron la solución de la enzima transaminasa (12,5 g), PLP (35 mg), DIW (15 ml) y una solución acuosa de clorhidrato de isopropilamina 4,0 M (7,5 ml, 30 m mol) en un matraz de 100 ml y se calentaron a 45 °C. La reacción de hidrólisis se añadió en una porción, seguida de DIW (6 ml, usada como un aclarado del recipiente). El pH de la reacción se ajustó a 7,25 utilizando isopropilamina pura y la reacción se agitó a 45 °C hasta que se completó la reacción. Después, la mezcla de reacción se calentó hasta una temperatura interna de 55 °C y el pH se ajustó a 4,0 utilizando ácido fórmico al 95 %.
- 15 Se añadió carbón Darco (125 mg) y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente antes de enfriar con hielo/agua durante 20 minutos. Después la mezcla se filtró a través de papel de Whatman n° 3. El filtrado se concentró hasta 1/3 de su peso y después se calentó a 55 °C. Después se ajustó el pH de la solución a pH 7,5 utilizando KOH al 50 %, tras lo cual la solución se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después hasta 0-5 °C en un baño de hielo/agua. Durante el enfriamiento se observó la precipitación del producto. La suspensión se filtró y se lavó con DIW/EtOH (10 ml, 1:1, a 0 °C). El precipitado de color blanco se secó durante 12 horas en un horno de vacío (45 °C) para producir la (S)-pregabalina con un rendimiento del 61 %, una pureza del 98,6 % p/p y un ee del 99,8 % (isómero S preferido).

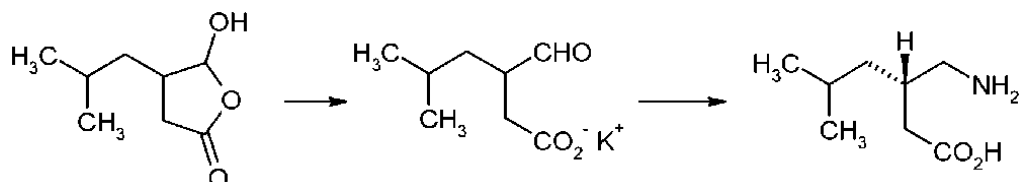
**Ejemplo 24****Preparación de la (S)-pregabalina a través de una hidrólisis de la 5-butoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona y una transaminación enzimática**

- Se suspendió la 5-butoxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona (3,21 g, 15 mmol, véase el ejemplo 13C) en DIW (8,5 g) y se enfrió en un baño de hielo/agua. Se añadió KOH acuoso (50 % p/p, 2,02 g, 1,2 eq) gota a gota mediante una jeringa durante 5 min. La reacción se retiró del baño de hielo/agua y se agitó a la ta durante 90 min. Después se ajustó el pH de la reacción a pH 7,0 utilizando ácido fórmico, y la mezcla de reacción se usó después como materia prima en la subsiguiente reacción de la transaminasa.
- 30 Se cargaron la solución de la enzima transaminasa (12,5 g), PLP (35 mg), DIW (15 ml) y una solución de clorhidrato de isopropilamina 4,0 M (7,5 ml, 30 mmol) en un matraz de 100 ml y se calentaron a 45 °C. La reacción de hidrólisis (véase más arriba) se añadió en una porción, seguida de DIW (6 ml, usada como un aclarado del recipiente). El pH de la reacción se ajustó a 7,25 utilizando isopropilamina pura y la reacción se agitó a 45 °C.
- 35 La mezcla de reacción se calentó hasta una temperatura interna de 55 °C y el pH se ajustó a 4,0 utilizando ácido fórmico al 95 %. Se añadió carbón Darco (125 mg) y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente antes de enfriar con hielo/agua durante 20 minutos. Después, la mezcla se filtró a través de papel de Whatman n° 3. El filtrado se concentró hasta 1/3 de su peso y después se calentó a 55 °C. Después se ajustó el pH de la solución a pH 7,5 utilizando KOH al 50 %, tras lo cual la solución se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después hasta 0-5 °C en un baño de hielo/agua. Durante el enfriamiento se observó la precipitación del producto. La suspensión se filtró y se lavó con DIW/EtOH (10 ml, 1:1, a 0 °C). El precipitado de color blanco se secó durante 12 horas en un horno de vacío (45 °C) para producir la (S)-pregabalina con un rendimiento del 51 %, una pureza del 98,4 % p/p y un
- 40

ee del 99,9 % del isómero S preferido.

### Ejemplo 25

**Preparación de la (S)-pregabalina a partir de la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona a través de una transaminación enzimática**

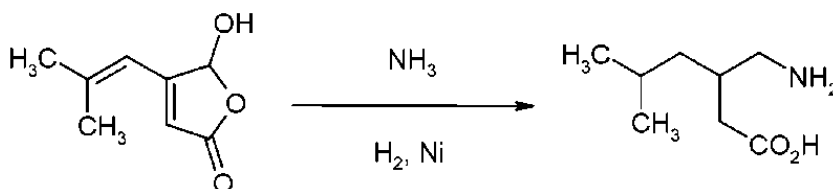


5 Se suspendió la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-dihidrofuran-2(3H)-ona (2,0 g, 12,5 m mol) en DIW (8,5 g) y se enfrió en un baño de hielo/agua, se añadió en porciones carbonato de potasio (0,863 g, 6,3 m mol) durante el transcurso de 5 min. La reacción se retiró del baño de hielo/agua y se agitó a la ta durante 90 min. El pH se ajustó a 7,0 utilizando ácido fórmico y la mezcla de reacción se usó después como materia prima en la subsiguiente reacción de la transaminasa.

10 Se cargaron la solución de la enzima transaminasa (10,4 g), PLP (30 mg), DIW (12,5 ml) y una solución acuosa de clorhidrato de isopropilamina 4,0 M (6,3 ml, 30 m mol) en un matraz de 100 ml y se calentaron a 45 °C. La reacción de hidrólisis se añadió en una porción, seguida de DIW (5 ml, usada como un aclarado del recipiente). El pH de la reacción se ajustó a 7,25 utilizando isopropilamina pura y la reacción se agitó a 45 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta una temperatura interna de 55 °C y se ajustó a pH 4,0 utilizando ácido fórmico al 95 %. Se añadió carbón Darco (125 mg) y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente antes de enfriar con hielo/agua durante 20 minutos. Después la mezcla se filtró a través de papel de Whatman n° 3. El filtrado se concentró hasta 1/3 de su peso y después se calentó a 55 °C. Después se ajustó el pH de la solución a pH 7,5 utilizando KOH al 50 %, tras lo cual la solución se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después hasta 0-5 °C en un baño de hielo/agua. Durante el enfriamiento se observó la precipitación del producto. La suspensión se filtró y se lavó con DIW/EtOH (10 ml, 1:1, a 0 °C). El precipitado de color blanco se secó durante 12 horas en un horno de vacío (45 °C) para producir la (S)-pregabalina con un rendimiento del 61 %, una pureza del 98,3 % p/p y un ee del 99,9 % del isómero S preferido.

### Ejemplo 26

25 **Preparación del ácido (R/S)-3-aminometil-5-metilhexanoico a través de una aminación reductora de la 5-hidroxi-4-(2-metil-prop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona**



30 Se hidrogenó una solución 0,01 M de la 5-hidroxi-4-(2-metilprop-1-en-1-il)furan-2(5H)-ona en una solución de amoníaco acuoso al 30 % (10 bar, temperatura ambiente) durante 48 h en presencia de 10 mol % de catalizador de níquel Raney. El catalizador se filtró y la solución se concentró para dejar un sólido. El producto se aisló mediante la adición de ácido clorhídrico a una suspensión de metanol y se encontró que era el clorhidrato del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico puro.

El uso de paladio como catalizador proporciona mezclas del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico y la correspondiente amina secundaria, el ácido 3-[(2-carboximetil-4-metil-pentilamino)-metil]-5-metil-hexanoico.

35 **Listado de secuencias**

#### SEQ ID NO. 1

Secuencia de aa genérica Vfat



MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMP SLHX<sup>27</sup>RGTWV VTHGEGPYX<sup>41</sup>VDVX<sup>45</sup>GRRYLDAN  
 SGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFD SGR  
 VFY TNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRX<sup>147</sup>NAYHGVTAVSASMTGX<sup>163</sup>P  
 X<sup>165</sup>NSVFGLPLPGFVHLX<sup>180</sup>CPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAG  
 FFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPD  
 AISSKNLTAGFFPVGAVILGPELX<sup>304</sup>KRLETAIEAIEEFPHGFTAX<sup>324</sup>GHPVGCAIALKAID  
 VVMNEGLAENVRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGN  
 LSVSX<sup>401</sup>RIANTCX<sup>408</sup>DLGLICX<sup>415</sup>X<sup>416</sup>X<sup>417</sup>GQSVILX<sup>424</sup>PPFILTEAQMD E MFDKLEKALD  
 KVFAEVA

X<sup>27</sup> se selecciona entre glutamina (Q) y ácido glutámico (E); X<sup>41</sup> se selecciona entre isoleucina (I) y valina (V); X<sup>45</sup> se selecciona entre asparragina (N) e histidina (H); X<sup>147</sup> se selecciona entre asparragina (N) y glutamina (Q); X<sup>163</sup> se selecciona entre leucina (L) y metionina (M); X<sup>165</sup> se selecciona entre tirosina (Y) e histidina (H); X<sup>180</sup> se selecciona entre treonina (T); glicina (G) y serina (S); X<sup>304</sup> se selecciona entre alanina (A) y serina (S); X<sup>324</sup> se selecciona entre glicina (G) y serina (S); X<sup>401</sup> se selecciona entre lisina (K) y ácido glutámico (E); X<sup>408</sup> se selecciona entre treonina (T) y glutamina (Q); X<sup>415</sup> se selecciona entre serina (S) y alanina (A); X<sup>416</sup> se selecciona entre prolina (P) y alanina (A); X<sup>417</sup> se selecciona entre leucina (L) y metionina (M); y X<sup>424</sup> se selecciona entre cisteína (C) y serina (S).

**SEQ ID NO. 2**

Secuencia de aa Vfat888

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMP SLHQ RGTWV VTHGEGPYIVDVNGRRYLDAN SGL  
 YNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFD SGRV F Y  
 TNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTAVSASMTGLPYNSVFG  
 LPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFFAEPVMGA  
 GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPD AISSKNLTA  
 GFFPVGAVILGPELAKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENV  
 RRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSERIANTCT  
 DLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMD E MFDKLEKALDKVFAEVA

**SEQ ID NO. 3**

Secuencia de aa Vfat906

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVWTHGEGPYIVDVNGRRYLDANGLY  
NMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYT  
NSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVTAVSASMTGLPYNSVFGL  
PLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAG  
GVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTAG  
FFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKVIDVMNEGLAENVR  
RLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQD  
LGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

**SEQ ID NO. 4**

5 Secuencia de aa Vfat999

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVWTHGEGPYVVDVNGRRYLDANGL  
YNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFY  
TNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFG  
LPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGA  
GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTA  
GFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKVIDVMNEGLAENV  
RRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQ  
DLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

**SEQ ID NO. 5**

10 Secuencia de aa Vfat1010

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVWTHGEGPYIVDVNGRRYLDANGLY  
NMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYT  
NSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGMPHNSVFG  
LPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGA  
GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTA  
GFFPVGAVILGPALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKVIDVMNEGLAENV  
RRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQ  
DLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

15 **SEQ ID NO. 6**

Secuencia de aa Vfat1020

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANGL  
YNMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFY  
TNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFG  
LPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGA  
GGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTA  
GFFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENV  
RRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQ  
DLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA

**SEQ ID NO. 7**

5 Secuencia de aa Vfat1030

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVTHGEGPYIVDVHGRRYLDANGLY  
NMVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYT  
NSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFG  
PLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAG  
GVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAG  
FFPVGAVILGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVR  
RLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQD  
LGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA

**SEQ ID NO. 10**

10 SECUENCIA DE ADN Vfat 888

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
CACTGATATGCCATCTCTGCACCAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
GGCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGCC  
TGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGC  
CCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAA  
CTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTCGCGT  
GTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAATGCTGTGGT

TTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTAACAA  
CGCATACCACGGTGTAAGTCTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAAC  
CTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATTG  
GCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCGC  
GAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTG  
CTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCC  
AGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTT  
ATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCAC  
CCCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
GCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGGCGAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCAGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTAT  
CGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGC  
CGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACA  
TCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAA  
AGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCGAGCGTATCGCTAACA  
CCTGTACCGACCTGGGCCTGATCTGTAGCCCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGTG  
CCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGAG  
AAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

**SEQ ID NO. 11**

5 SECUENCIA DE ADN Vfat 906

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
 CACTGATATGCCATCTCTGCACgAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
 GGCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGAACTCCGGCC  
 TGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGC  
 CCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAAA  
 CTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTGACAGCGGTTCGCGT  
 GTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGGT  
 TTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGT<sup>aac</sup>AAC  
 GCATACCACGGTGTA<sup>ACT</sup>GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACA<sup>ACT</sup>C  
 TGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTTCGTTCACCTGACCTGTCCGCACTATTGG  
 CGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCG  
 AGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGC  
 TGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCA  
 GGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTTA  
 TCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACC  
 CCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTTCTTTCCGGTTGGTG  
 CTGTGATTCTGGGTCCGGA<sup>ACT</sup>GAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTAT  
 CGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCC<sup>ggc</sup>GGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATC  
 GCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCC  
 GCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACAT  
 CGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACAAA  
 GCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGC<sup>aaa</sup>CGTATCGCTAACACC  
 TGT<sup>cag</sup>GACCTGGGCCTGATCTGTAGCgCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGTGCCC  
 GCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAACTGGAGAAG  
 GCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

**SEQ ID NO. 12**5 SECUENCIA DE ADN Vfat 999

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
 CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
 GGCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGC  
 CTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGG  
 CCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAA  
 ACTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTTCGACAGCGGTCCGG  
 TGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGG  
 TTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAA  
 ACGCATACCACGGTGTAAGTCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAA  
 CTCTGTATTCCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATT  
 GGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG  
 CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTT  
 GCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTC  
 CAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGT  
 TATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCA  
 CCCC GGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
 GCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
 TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTGCGCTA  
 TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
 CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
 ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
  
 AAGCATCTAAAACCCATTTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
 ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGCTGGGTGAGTCCGTTATCCTGA  
 GCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
 GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

**SEQ ID NO. 13**

5 SECUENCIA DE ADN Vfat 1010

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
GGCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGCC  
TGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGC  
CCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAA  
CTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTGACAGCGGTGCGGT  
GTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGGT  
TTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAA  
CGCATACCACGGTGTAAGTGTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTATGCCGCACAAC  
TCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGACCTGTCCGCACTATTG  
GCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGC  
GAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTG  
CTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCC  
AGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGTT  
ATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCAC  
CCCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
GCTGTGATTCTGGGTCCGGCACTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTA  
TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
AAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGA  
GCCCCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

**SEQ ID NO. 14**

5 SECUENCIA DE ADN Vfat 1020

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
GGCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCCGCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGC  
CTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGG  
CCCAGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTTCGTATGTCTGATCAA  
ACTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTCCGCG  
TGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGG  
TTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAA  
ACGCATACCACGGTGTAACTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAA  
CTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGGGTTGTCCGCACTATT  
GGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCCG  
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTT  
GCTGAGCCGGTCATGGGC GCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTC  
CAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGT  
TATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCA  
CCCCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
GCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCCGGTGGGTTGCGCTA  
TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
CCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
AAGCATCTAAAACCCATTTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGA  
GCCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

**SEQ ID NO. 15**

5 SECUENCIA DE ADN Vfat 1030

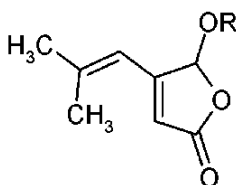
ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAAACTTACTCTCTGTACGGCTT  
CACTGATATGCCATCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAG  
GGCCATACATCGTGGACGTCCACGGTCCGCGTTACCTGGACGCAAACCTCCGGC  
CTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGG



CCCAGTACGAACGCTTCCC GGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAA  
ACTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGTGTCTCCATTGACAGCGGTTCGCG  
TGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGTGG  
TTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAA  
ACGCATAACCACGGTGTAAGTGTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAA  
CTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGAGCTGTCCGCACTATT  
GGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCG  
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCCGCGGACACGATTGCCGGGCTTCTTT  
GCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTC  
CAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGAAGT  
TATCTGCCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCA  
CCCCGGATGCGATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGT  
GCTGTGATTCTGGGTCCGGAAGTGAAGCAACGCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTA  
TCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTA  
TCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCG  
CCGCCTGGCACC GCGTTTTGAGGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAAC  
ATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAAGACA  
AAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAAC  
ACCTGTCAGGACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGA  
GCCCCGCCGTTATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAAACTGGA  
GAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula (VI)



(VI)

en la que R se selecciona entre:

- 5        hidrógeno,  
           alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
           haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
           alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
           alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
 10        cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados  
           independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           cicloalquil (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o  
           3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           arilo, que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre  
 15        halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           arilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos  
           seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           R<sup>1</sup>-C(O)-, y R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-;

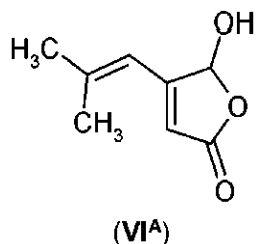
R<sup>1</sup> se selecciona entre:

- 20        hidrógeno,  
           alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
           haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
           alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
           alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
 25        cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados  
           independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           cicloalquil (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o  
           3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           arilo, que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre  
 30        halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), y  
           arilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos  
           seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>); y

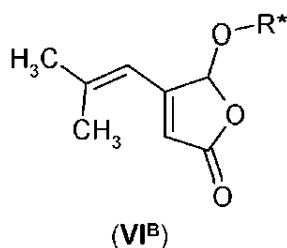
R<sup>2</sup> se selecciona entre:

- 35        alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
           haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
           alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
           alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
           cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados  
           independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
 40        cicloalquil (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o  
           3 grupos seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
           arilo, que puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre  
           halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y  
           arilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos  
 45        seleccionados independientemente entre halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) y alquiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>).

2. El compuesto de la reivindicación 1 que es la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona según la fórmula (VI<sup>A</sup>)



3. El compuesto de fórmula (VI<sup>B</sup>)

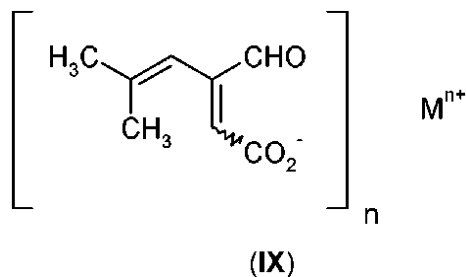


5 en la que R\* es un grupo hidrocarbonado quiral (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>).

4. El compuesto según la reivindicación 3 en el que R\* se selecciona entre (R)- o (S)- $\alpha$ -metilbencilo, (R)- o (S)-1-(1-naftil)etilo, (R)- o (S)-1-(2-naftil)etilo, mentilo y bornilo.

5. El compuesto según la reivindicación 1 en el que R es R<sup>1</sup>-C(O)- o R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, y R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son grupos hidrocarbonados quirales (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>).

10 6. Un compuesto de fórmula (IX)



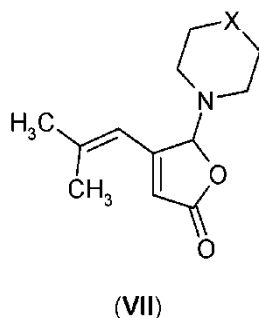
en la que:

n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>, ((alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>4</sub>N<sup>+</sup>; o n es 2 y M<sup>2+</sup> se selecciona entre Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>.

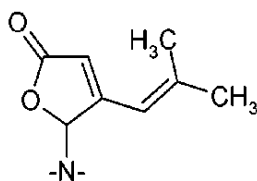
15 7. El compuesto según la reivindicación 6 en el que n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

8. El compuesto según la reivindicación 6 en el que n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

9. Un compuesto de fórmula (VII)



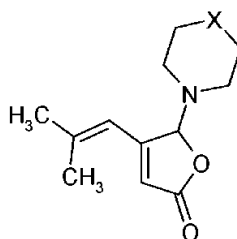
en la que -X- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))- , -N(bencil)-, o



10. El compuesto según la reivindicación 9 seleccionado entre:

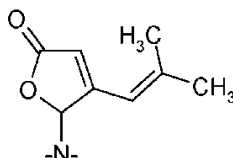
- 5 4-(2-metilpropenil)-5-pirrolidin-1-il-5H-furan-2-ona;  
 4-(2-metilpropenil)-5-piperidin-1-il-5H-furan-2-ona;  
 4-(2-metilpropenil)-5-morfolin-4-il-5H-furan-2-ona; y  
 1,4-bis-(4-(2-metilpropenil)-5H-furan-2-on-5-il) piperazina.

11. Un procedimiento fabricaciónde fabricación del compuesto de fórmula (VI<sup>A</sup>) según la reivindicación 2 que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VII)



(VII)

- 10 en la que -X- representa un enlace sencillo, -CH<sub>2</sub>-, -O-; -NH-, -N(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))-, -N(bencil)-,  
 o



con agua en presencia de un catalizador ácido.

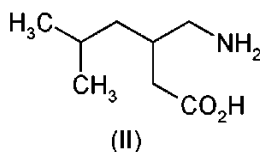
- 15 12. Un procedimiento fabricaciónde fabricación de un compuesto de fórmula (VI) según la reivindicación 1 en el que R es distinto a hidrógeno, R<sup>1</sup>-C(O)- y R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VI<sup>A</sup>) con un alcohol R-OH en presencia de un catalizador ácido.

13. Un procedimiento fabricaciónde fabricación de un compuesto de fórmula (VI) según la reivindicación 1 en el que R es distinto a hidrógeno, R<sup>1</sup>-C(O)- y R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-, que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VII) con un alcohol R-OH en presencia de un ácido estequiométrico.

- 20 14. Un procedimiento fabricaciónde fabricación de un compuesto de fórmula (VI) según la reivindicación 1 en el que R es R<sup>1</sup>-C(O)-, que comprende las etapas de tratamiento de un compuesto de fórmula (VI<sup>A</sup>) con un cloruro de ácido R<sup>1</sup>-C(O)-Cl o un anhídrido de ácido (R<sup>1</sup>-C(O))<sub>2</sub>O.

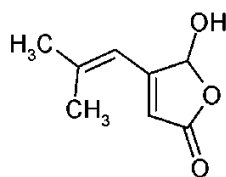
- 25 15. Un procedimiento fabricaciónde fabricación de un compuesto de fórmula (VI) según la reivindicación 1 en el que R es R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-; que comprende la etapa de tratamiento de un compuesto de fórmula (VI<sup>A</sup>) con un cloruro de sulfonilo R<sup>2</sup>-SO<sub>2</sub>-Cl.

16. Un procedimiento fabricaciónde fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II)



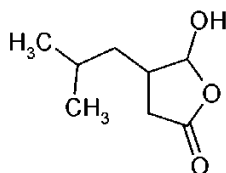
o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:

- (a) la preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VI<sup>A</sup>)



(VI<sup>A</sup>)

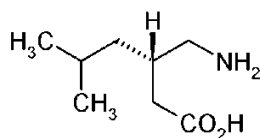
(b) la conversión de dicha 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona en la 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona (I<sup>A</sup>)



(I<sup>A</sup>)

5 y  
(c) la conversión de dicha 5-hidroxi-4-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-5H-2-furanona en el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II).

17. El procedimiento según la reivindicación 16 en el que el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II) es el ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico ((S)-II)



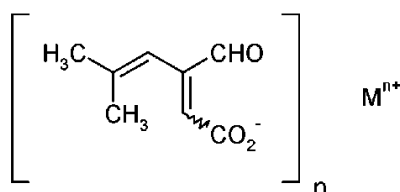
((S)-II)

10 en el que dicho ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico tiene un exceso enantiomérico de al menos el 80 %.

18. El procedimiento según la reivindicación 16 o 17 en el que la etapa (a) comprende un procedimiento según la reivindicación 11.

15 19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en el que la etapa (b) comprende las siguientes etapas:

(b1) el tratamiento de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VI<sup>A</sup>) con un óxido, un hidróxido, un carbonato o un bicarbonato metálico, amoniaco, una mono- di- o trialquilamina (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) o un hidróxido de tetraalquilamonio (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), para formar una sal de fórmula (IX)

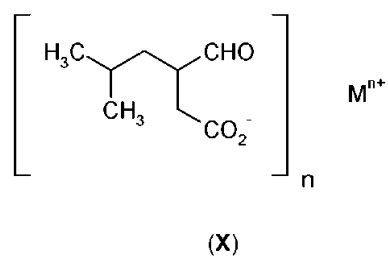


(IX)

20 en la que:

n es 1 y M<sup>+</sup> se selecciona entre Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>, (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>))<sub>4</sub>N<sup>+</sup>; o n es 2 y M<sup>2+</sup> se selecciona entre Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>;

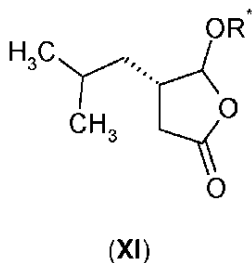
(b2) la hidrogenación de la sal de fórmula (IX) para obtener una sal de fórmula (X)



y  
(b3) el tratamiento de la sal de fórmula (X) con un ácido.

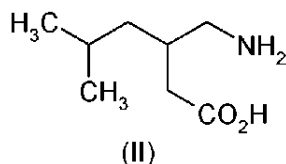
5 20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en el que la etapa (b) comprende las siguientes etapas:

(b1) la conversión de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VI<sup>A</sup>) en un compuesto de fórmula (VI) según se define en la reivindicación 3 en la que R es un grupo hidrocarbonado quiral (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>);  
(b2) la hidrogenación del compuesto de fórmula (VI) para obtener un compuesto de fórmula (XI)



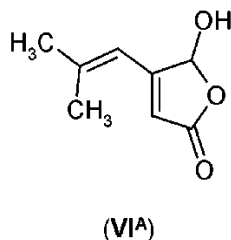
10 en la que R\* es un grupo hidrocarbonado quiral (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>); y  
(b3) el tratamiento del compuesto de fórmula (XI) con un ácido para dar ((S)-I<sup>A</sup>).

21. Un procedimiento fabricaciónde fabricación del ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II)

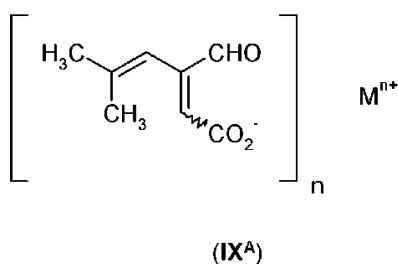


o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:

15 (a) la preparación de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VI<sup>A</sup>)



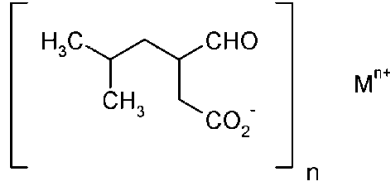
(b) el tratamiento de la 5-hidroxi-4-(2-metil-1-propenil)-5H-2-furanona (VI<sup>A</sup>) con amoníaco o una monoalquilamina (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) para formar una sal de fórmula (IX<sup>A</sup>)



en la que:

n es 1 y  $M^+$  se selecciona entre  $NH_4^+$  y (alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)) $NH_3^+$ ;

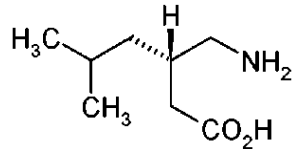
(c) la hidrogenación de la sal de fórmula (IX<sup>A</sup>) para obtener una sal de fórmula (X<sup>A</sup>)



(X<sup>A</sup>) ;

5 y (d) el tratamiento de la sal de fórmula (X<sup>A</sup>) con una transaminasa o una enzima oxidasa de amina / reductasa de imina para proporcionar el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II).

22. El procedimiento según la reivindicación 21 en el que el ácido 3-aminometil-5-metilhexanoico (II) es el ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico ((S)-II)



((S)-II)

10

en el que dicho ácido (S)-3-aminometil-5-metilhexanoico tiene un exceso enantiomérico de al menos el 80 %.

23. El procedimiento según la reivindicación 21 o 22 en el que la etapa (a) comprende un procedimiento según la reivindicación 11.