

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 354**

51 Int. Cl.:

C07C 227/34 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07C 229/32 (2006.01)
C07B 57/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2010** **PCT/JP2010/055202**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010** **WO10110361**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010** **E 10756157 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2412700**

54 Título: **Procedimiento de producción de un derivado de ácido γ -amino bicclico**

30 Prioridad:

26.03.2009 JP 2009075792

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2017

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi- Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

KITAGAWA, YUTAKA y
IMAI, MAKOTO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 635 354 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 de producción de un derivado de ácido γ -amino bícíclico

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un derivado de ácido γ -amino bícíclico o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. Particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene actividad como un ligando $\alpha_2\delta$ y afinidad por la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje, o un procedimiento de producción del mismo.

Técnica antecedente

- 10 Los compuestos que exhiben unión de alta afinidad a la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje han demostrado ser eficaces para el tratamiento, por ejemplo, de dolor neuropático (véase, por ejemplo, las literaturas no de patente 1 y 2). En este contexto, el dolor neuropático se refiere al dolor crónico causado por lesión del tejido nervioso, etc., y es una enfermedad que afecta de manera significativa la calidad de vida de tal manera que los pacientes padecen depresión debido a severos ataques de dolor.

- 15 En la actualidad, se conocen varios tipos de ligandos $\alpha_2\delta$ como fármacos terapéuticos para dicho dolor neuropático. Los ejemplos de ligandos $\alpha_2\delta$ incluyen gabapentina y pregabalina. Los ligandos $\alpha_2\delta$, tales como estos compuestos, son útiles para el tratamiento de la epilepsia y del dolor neuropático o afecciones similares (por ejemplo, literatura de patente 1).

- 20 Sin embargo, se ha informado de que, por ejemplo, para gabapentina, su eficacia en el tratamiento de neuralgia postherpética es de aproximadamente el 60% según la evaluación de los propios pacientes (véase, por ejemplo, la literatura no de patentes 3) y que para pregabalina, su eficacia en el tratamiento de neuropatía diabética dolorosa es de aproximadamente el 50% según la evaluación de los propios pacientes (véase, por ejemplo, la literatura no de patente 4).

Otros compuestos se divulgan, por ejemplo, en la literatura de patente 2, 3 y 4.

Lista de referencias

Literatura de patente

Literatura de patentes 1: Publicación Internacional N° WO 04/006836

- 25 Literatura de patentes 2: Publicación Internacional N° WO 99/21824

Literatura de patentes 3: Publicación Internacional N° WO 01/28978

Literatura de patentes 4: Publicación Internacional No. WO 02/085839

Literatura no de patente

Literatura no de patentes 1: J Biol. Chem. 271 (10): 5768-5776, 1996

- 30 Literatura no de patentes 2: J Med. Chem. 41:1838-1845, 1998

Literatura no de patentes 3: Acta Neurol. Scand. 101: 359-371, 2000

Literatura no de patentes 4: Drugs 64 (24): 2813-2820, 2004

Sumario de la invención

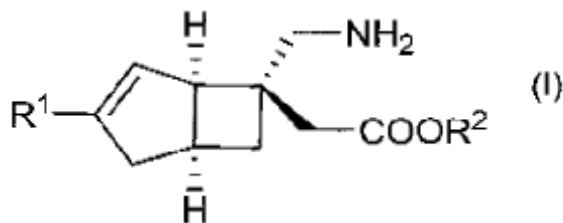
Problema técnico

- 35 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de producción de un derivado de ácido γ -amino bícíclico que tenga una excelente actividad como un ligandos $\alpha_2\delta$ y un intermedio para la producción del mismo, y sus sales.

Solución al problema

La presente invención se describirá a continuación.

- 40 (1) Un procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo mediante resolución óptica:



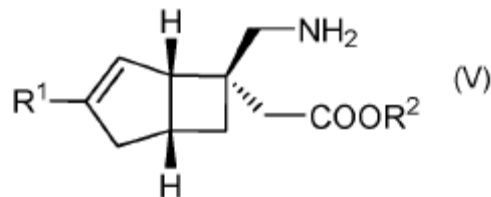
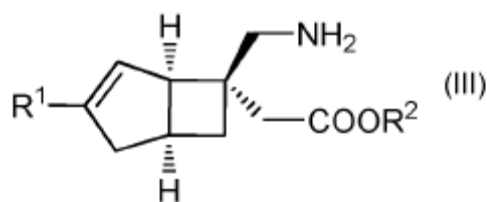
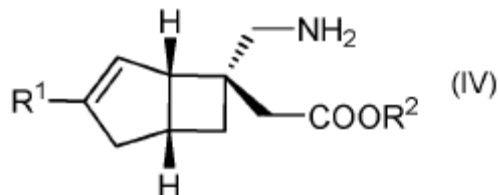
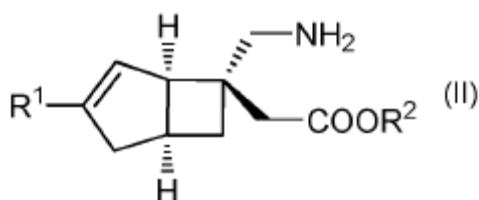
en la que cada sustituyente se define como sigue:

R¹: Un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6, y

R²: Un átomo de hidrógeno o un grupo protector para el grupo carboxi,

en el que el procedimiento comprende

disolver una mezcla de compuestos representados por las fórmulas generales (II), (III), (IV) y (V) y un ácido orgánico ópticamente activo en un disolvente:



en la que las fórmulas generales (I) y (II) son las mismas, en la que el ácido orgánico ópticamente activo es ácido D-mandélico o ácido O-acetil-D-mandélico,

en el que el disolvente es acetonitrilo, acetato de etilo, tolueno o ciclopentil metil éter,

y, a continuación, depositar un cristal.

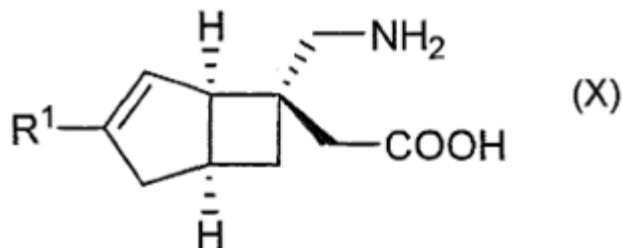
Además, aspectos de la presente invención son preferentemente tal como se muestra a continuación.

(2) El procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo según (1), en el que R¹ es un átomo de hidrógeno, un grupo metilo o un grupo etilo.

(3) El procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo según (1) o (2), en el que R² es un grupo t-butilo.

Además, la presente invención abarca también un procedimiento de producción mostrado a continuación.

(4) Un procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (X) o una sal del mismo:



en la que cada sustituyente se define como sigue:

R^1 : Un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6,

en el que el procedimiento comprende

desproteger un grupo protector para el grupo carboxi en un compuesto representado por la fórmula general (I) producido mediante un procedimiento de producción según (1) o realizar esta desprotección y formar además un ácido o una sal.

Efectos ventajosos de la invención

El procedimiento de producción según la presente invención puede proporcionar un derivado de ácido γ -amino bicclico que tiene una excelente actividad como un ligando $\alpha_2\delta$, un intermedio para producir el mismo, o sus sales.

Descripción de las realizaciones

Un "grupo alquilo C1-C6" se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono e incluye grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, 2- metilbutilo, neopentilo, 1-etilpropilo, hexilo, isohexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo, 1-metilpentilo, 3,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2- dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo y 2-etilbutilo.

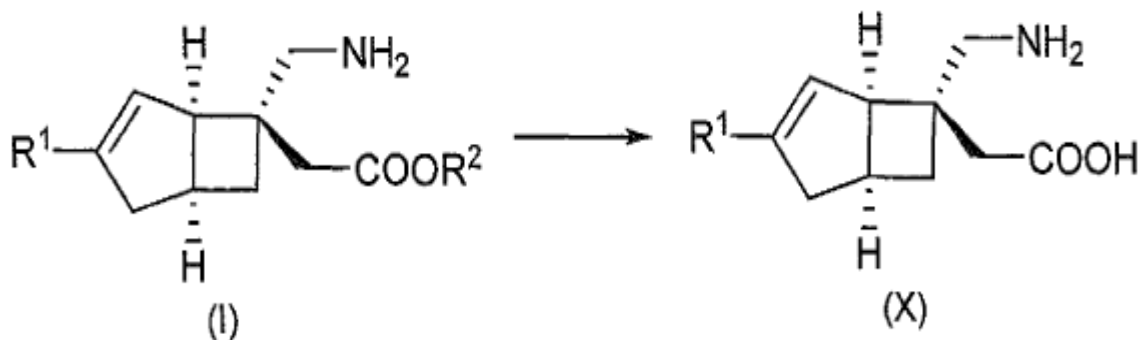
Debido a que un compuesto representado por la fórmula general (I), o similar, con grupos amino y/o carboxilo en la estructura, forma una sal mediante una reacción con un ácido o una base, una "sal" o una "sal farmacológicamente aceptable" se refiere a esta sal.

En la nomenclatura de los compuestos en la presente memoria descriptiva, "*" representa que cada compuesto que tiene átomos de carbono asimétricos indicado de esta manera es una mezcla racémica. Sin embargo, la indicación "(1S*,5R*,6R*)-" representará su relación en términos de configuración relativa.

El compuesto representado por la fórmula general (I), o similar, cuando se deja al aire o se recristaliza, puede asociarse con agua adsorbida mediante absorción de agua para formar un hidrato. Dicho hidrato está abarcado también por la sal de la presente invención.

Los ejemplos de un "grupo protector para el grupo carboxi" incluyen grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, hexilo, bromo-tert-butilo, tricloroetilo, bencilo, p-nitrobencilo, o-nitrobencilo, p-metoxibencilo, p-t-butilbencilo, acetoximetilo, propioniloximetilo, butiriloximetilo, isobutiriloximetilo, valeriloximetilo, pivaloiloximetilo, acetoxietilo, acetoxipropilo, acetoxibutilo, propioniloxietilo, propioniloxipropilo, butiriloxietilo, isobutiriloxietilo, pivaloiloxietilo, hexanoiloxietilo, isobutiriloximetilo, etilbutiriloximetilo, dimetilbutiriloximetilo, pentanoiloxietilo, metoxycarboniloximetilo, etoxycarboniloximetilo, propoxycarboniloximetilo, t-butoxycarboniloximetilo, metoxycarboniloxietilo, etoxycarboniloxietilo, isopropoxycarboniloxietilo, t-butildimetilsililo, trimetilsililo, metoximetilo, etoximetilo, propoximetilo, isopropoximetilo, (2-metiltio)etilo, 3-metil-2-butenilo, 5-indanilo y 3-ftalidilo. El grupo protector es preferentemente un grupo t-butilo.

El grupo carboxilo en el compuesto representado por la fórmula general (I) puede desprotegerse mediante un procedimiento habitual para la desprotección de grupos carboxi, por ejemplo, un procedimiento descrito en T. W. Greene y P. G. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis (3ª ed., 1999)", para producir un compuesto representado por la fórmula general (X).



El compuesto representado por la fórmula general (X) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo muestra actividad como un ligando $\alpha_2\delta$ y afinidad por la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje y es útil como un ingrediente activo en una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o la prevención del dolor, compromiso del sistema nervioso central y otros trastornos.

- 5 Una composición farmacéutica que comprende el compuesto que tiene la fórmula general (X) o la sal farmacológicamente aceptable del mismo, cuando se administran a mamíferos (por ejemplo, seres humanos, caballos, vacas o cerdos, preferentemente seres humanos), se administra sistémica o localmente a través de una vía oral o parenteral.

- 10 La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse en una forma apropiada seleccionada según el procedimiento de administración, mediante procedimientos de preparación usados normalmente para diversas preparaciones.

- 15 Las formas de la composición farmacéutica para la administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. La composición farmacéutica en dicha forma tal se prepara según un procedimiento estándar seleccionando, de manera apropiada, según las necesidades, aditivos de entre excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes de hinchamiento, adyuvantes de hinchamiento, agentes de revestimiento, plastificantes, estabilizadores, antisépticos, antioxidantes, agentes colorantes, solubilizantes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, conservantes, tampones, diluyentes, agentes humectantes, etc. usados normalmente.

- 20 Las formas de la composición farmacéutica para la administración parenteral incluyen inyecciones, ungüentos, geles, cremas, cataplasmas, parches, aerosoles, inhalantes, aerosoles, gotas para los ojos, gotas nasales y supositorios. La composición farmacéutica en dicha forma se prepara según un procedimiento estándar seleccionando, de manera apropiada, según las necesidades, aditivos de entre estabilizantes, antisépticos, solubilizantes, humectantes, conservantes, antioxidantes, aromas, agentes gelificantes, agentes neutralizantes, solubilizantes, tampones, agentes de tonicidad, agentes tensioactivos, agentes colorantes, agentes de tamponación, espesantes, agentes humectantes, cargas, promotores de absorción, agentes de suspensión, aglutinantes, etc. usados normalmente.

- 25 La dosis del compuesto que tiene la fórmula general (X) o la sal farmacológicamente aceptable del mismo varía dependiendo de los síntomas, la edad, el peso corporal, etc., y es, para la administración oral, de 1 a 2.000 mg, preferentemente de 10 a 600 mg (en términos de la cantidad del compuesto) por dosis a un ser humano adulto (peso corporal: aproximadamente 60 Kg) y, para la administración parenteral, de 0,1 a 1.000 mg, preferentemente de 1 a 300 mg (en términos de la cantidad del compuesto) por dosis a un adulto.

Ejemplos

(Ejemplo de preparación)

- 35 Se mezclan 5 g del compuesto que tiene la fórmula general (X), 90 g de lactosa, 34 g de almidón de maíz, 20 g de celulosa cristalina y 1 g de estearato de magnesio usando un mezclador y, a continuación, se comprime usando una máquina de formación de comprimidos para obtener un comprimido.

(Ejemplo de ensayo 1) Construcción de un plásmido de expresión génica de subunidad $\alpha_2\delta_1$ de canal de calcio humano (en adelante, denominado Cacna2d1 humano), y preparación de fracción de membrana celular que expresa Cacna2d1 humano

a) Construcción del plásmido de expresión pRK/hCacna2d1 de Cacna2d1 humano

- 40 a-1) Preparación de fragmento de ADN

El gen Cacna2d1 humano se obtuvo como dos fragmentos, el primer semi-fragmento y el segundo semi-fragmento. Se realizó una PCR usando una biblioteca de ADNc (QUICK-Clone cDNA Human Brain (Clontech Laboratories, Inc.)) como una plantilla y una enzima KOD polimerasa (TOYOBO CO., LTD.) según el protocolo incluido con esta enzima. Los cebadores de PCR usados fueron, para el primer, cebadores que tenían las secuencias siguientes:

- 45 Cebador 1: 5'-agctgcgcc gctagcgcca ccatggctgg ctgcctgctg gc-3' (SEC ID N°: 1), y

Cebador 2: 5'-attaggatcg attgcaaagt aataccc-3' (SEC ID N°: 2); y

para el segundo semi-fragmento, cebadores que tenían las secuencias siguientes:

Cebador 3: 5'-aatgggtatt actttgcaat cgatcc-3' (SEC ID N°: 3), and

Cebador 4: 5'-agtcggatcc tcataacagc cgggtgtgtc tg-3' (SEC ID N°: 4)

adquiridos en Sigma Genosys. La reacción de PCR se realizó tanto para el primer semi-fragmento como para el segundo semi-fragmento usando un termociclador (GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc.)) mediante un procedimiento que implica el calentamiento a 94°C durante 1 minuto, a continuación 35 ciclos térmicos (94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 68°C durante 2 minutos), 68°C durante 5 minutos y enfriamiento a 4°C.

Estos dos productos de reacción se purificaron usando un kit de purificación de productos de PCR (MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN)) según el protocolo incluido en el kit. El primer semi-fragmento obtenido se digirió con una enzima de restricción Not1 (TOYOBO CO., LTD.). El segundo semi-fragmento se digirió con las enzimas de restricción Cla1 (TOYOBO CO., LTD.) y BamH1 (TOYOBO CO., LTD.). Posteriormente, estos fragmentos se purificaron usando un kit de purificación de producto de reacción (MiniElute Kit Reaction Cleanup (QIAGEN)) según el protocolo incluido en el kit.

a-2) Preparación de vector

El sitio de multiclonación (en adelante, denominado MCS) de un vector de expresión pRK5 para células animales (BD Pharmingen) se cambió al MCS de un vector pBluescript 2 (STRATAGENE) para preparar un vector. Específicamente, pRK5 se trató con las enzimas de restricción Cla1 (TOYOBO CO., LTD.) y Hind3 (TOYOBO CO., LTD.) y, a continuación, ambos extremos de este ADN se cortaron para obtener extremos romos usando Klenow Fragment (TAKARA BIO INC.). Ambos extremos se desfosforilaron adicionalmente usando fosfatasa alcalina de intestino de ternera (en adelante, denominada CIAP; TAKARA BIO INC.) y, a continuación, el fragmento se purificó usando MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN). A continuación, este ADN tratado con enzimas se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio. A continuación, se separó una porción de banda que corresponde a aproximadamente 4,7 kpb bajo irradiación UV usando una cuchilla. El ADN se extrajo de la misma usando un kit de extracción de gel/purificación (MiniElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)) según el protocolo incluido en este kit.

Para obtener un fragmento de ADN correspondiente a la MCS de pBluescript 2, pBluescript 2 se trató con las enzimas de restricción Sac1 (TOYOBO CO., LTD.) y Kpn1 (TOYOBO CO., LTD.) y, a continuación, ambos extremos de este ADN se cortaron para obtener extremos romos usando Klenow Fragment (TAKARA BIO INC.). A continuación, este ADN tratado con enzima se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2,0%. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio. A continuación, una porción de banda que correspondía a aproximadamente 100 pb se separó bajo irradiación UV usando una cuchilla. El ADN se extrajo de la misma usando un kit de extracción de gel/purificación (MiniElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)) según el protocolo incluido en este kit.

El fragmento de ADN obtenido y el pRK5 ya escindido se ligaron usando un kit de ligación de ADN (TAKARA BIO INC.) según el protocolo incluido en el kit. Con este producto de reacción, células *E. coli* DH5 α competentes (TOYOBO CO., LTD.) se transformaron para obtener colonias resistentes a la ampicilina. Algunas de las colonias se recogieron y, a continuación, las colonias recogidas se cultivaron. A partir de las células bacterianas obtenidas, se extrajo un plásmido y se analizó para determinar su secuencia de nucleótidos usando un secuenciador de ADN (Model 3700 (Applied Biosystems, Inc.)) para confirmar la introducción de la secuencia de MCS en el pRK5. En este contexto, un vector en el que, cuando el promotor CMV se considera como situado aguas arriba, la secuencia de MCS se incorporó de manera que estaba orientada en una dirección aguas abajo como sigue:

5'-ccaccgcgggtggcggccgctctagaactagtgatccccgggctgcaggaattcga tatcaagcttatcgataccgctcgacctcgaggggggcccg-3' (SEC ID N°: 5) se denominó como pRK-SK, y un vector en el que la secuencia de MCS se incorporó en una orientación opuesta a la misma se denominó pRK-KS.

a-3) Construcción del plásmido

El pRK-SK obtenido en el apartado a-2) se trató con una enzima de restricción Xba1 (TOYOBO CO., LTD.), y ambos extremos del ADN se cortaron para obtener extremos romos usando Klenow Fragment (TAKARA BIO INC.). El ADN con extremos romos se digirió adicionalmente con una enzima de restricción Not1 (TOYOBO CO., LTD.) y se purificó de la misma manera que en el apartado a-2). Este pRK-SK linearizado de esta manera y el primer semi-fragmento de ADN del gen *Cacna2d1* humano obtenido en el apartado a-1) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, y se extrajeron ADNs de aproximadamente 4,7 kpb y aproximadamente 1,5 kpb del gel y se purificaron de la misma manera que en el apartado a-2). Los dos ADNs obtenidos se ligaron de la misma manera que en el apartado a-2), y *E. coli* se transformó con el producto de ligación. A partir de los clones de *E. coli* obtenidos, se extrajo un plásmido y se analizó para determinar su secuencia de nucleótidos usando un secuenciador de ADN (Model 3700 (Applied Biosystems, Inc.)) para confirmar la introducción de la secuencia representada por la SEC ID N°: 6 en el mismo. A continuación, el plásmido obtenido se trató con las enzimas de restricción Cla1 (TOYOBO CO., LTD.) y BamH1 (TOYOBO CO., LTD.), y se llevaron a cabo un tratamiento CIAP y una purificación de la misma manera que en el apartado a-2). De esta manera, este ADN de plásmido linearizado y el segundo semi-fragmento de ADN del gen *Cacna2d1* humano obtenido en el apartado a-1) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, y se extrajeron ADNs de aproximadamente 6,2 kpb y aproximadamente 1,8 kpb del gel y se purificaron de la misma manera que en el apartado a-2). Los dos ADNs obtenidos se ligaron de la misma manera que en el apartado a-2), y *E. coli* se transformó con el producto de ligación. A partir de los clones de *E. coli* obtenidos, se extrajo un plásmido y se analizó para determinar su secuencia de nucleótidos usando un secuenciador de ADN (Model 3700 (Applied Biosystems, Inc.)) para confirmar la introducción de la secuencia representada por la SEC ID N°: 7 en el vector pRK-SK. El plásmido obtenido se denominó PRK/hCacna2d1.

b) Obtención de una línea celular 293 que expresan Cacna2d1 humano. Células 293 se cotransfectaron con el plásmido de expresión Cacna2d1 humano pRK/hCacna2d1 construido en el apartado a), y se obtuvo una línea celular que expresaba de manera estable Cacna2d1 humano con expresión de la proteína humana Cacna2d1 como un índice. Específicamente, se inocularon 2×10^6 células 293 en una placa de $\phi 6$ cm y se cultivaron durante 12 horas. A continuación, las células se cotransfectaron con 5 μ g de pRK/hCacna2d1 y 0,5 μ g de un plásmido de expresión del gen resistente a la neomicina pSV2neo (Clontech) usando un reactivo de transfección Lipofectamine Plus (Invitrogen Corp.) según el protocolo incluido en el reactivo.

Las células transfectadas de esta manera se recogieron, a continuación se inocularon en una placa de $\phi 15$ cm después de la dilución, y se cultivaron durante 2 semanas en DMEM (Invitrogen Corp.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cansera International, Inc.) y 500 μ g/ml de G418 (Invitrogen Corp.). Las células resistentes a la neomicina que formaron colonias con éxito se aislaron. Después del cultivo de expansión, las células se recogieron, y el lisado celular se evaluó mediante un ensayo de Western para obtener una línea celular 293 que expresaba Cacna2d1 humano. En el ensayo de Western, se usaron anticuerpos anti-hCacna2d1 (Chemicon Inc.) como anticuerpos primarios.

c) Preparación de la fracción de membrana celular de célula 293 que expresa Cacna2d1 humano

Las células 293 que expresan Cacna2d1 humano obtenidas en el apartado b) se cultivaron a gran escala en DMEM (Invitrogen Corp.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cansera International, Inc.) y 500 μ g/ml de G418 (Invitrogen Corp.), y las células se recogieron. Se añadió un inhibidor de proteasa (EDTA completo libre (Roche Applied Science)) en una cantidad recomendada por el reactivo a un tampón de ensayo de unión (MOPS 10 mM (pH 7,4), HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM) para preparar un tampón de preparación de fracción de membrana. Las células recogidas se lavaron con el tampón de preparación de fracción de membrana y, a continuación, se homogeneizaron usando un ultrasonificador. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 1 hora usando una centrífuga. El sobrenadante se desechó y el precipitado se suspendió en el tampón de preparación de fracción de membrana. El procedimiento desde la ultrasonificación usando un ultrasonificador hasta la suspensión del precipitado después de la centrifugación se repitió adicionalmente tres veces, y la suspensión obtenida se usó como una fracción de membrana de célula que expresa Cacna2d1 humano. El nivel total de proteínas contenidas en la fracción de membrana se calculó a partir de absorbancia UV a una longitud de onda de 280 nm.

(Ejemplo de ensayo 2) Construcción de un sistema de detección para la reacción de unión entre Cacna2d1 y gabapentina (en adelante, denominada GBP), y detección de las actividades inhibitoras de la reacción de unión Cacna2d1/GBP de los compuestos de ensayo

a) Construcción del sistema de detección para la reacción de unión entre Cacna2d1 y GBP

La fracción de membrana de célula que expresa Cacna2d1 humano y GBP marcada con un radioisótopo ^3H (en adelante, denominada ^3H GBP; Tocris Cookson Ltd.) se diluyeron con un tampón de ensayo de unión (MOPS 10 mM (pH 7,4), HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM) a una concentración final de 2,5 mg/ml en términos del nivel de proteína total y una concentración final de ^3H -GBP de 4,5 nM, respectivamente, para preparar 120 μ l de una solución de reacción, que a su vez se dejó en reposo a 4°C durante 3 horas. Este producto de reacción se añadió a los pocillos de una placa de filtro (UniFilter 350 GF/B (Whatman)) y se filtró a través del filtro. A continuación, un procedimiento de lavado que implica la adición de 350 μ l de un tampón de unión de ensayo (MOPS 10 mM (pH 7,4), HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM) y filtración a través del filtro se repitió tres veces. La placa de filtro se secó a fondo, y la parte inferior se selló. Después de la adición de 50 μ l de Microscint 20 (PerkinElmer Inc.), la superficie superior se selló también, y se realizó un recuento de la radiación derivada desde el radioisótopo ^3H que permanecía en el filtro usando TopCount (PerkinElmer Inc.). A partir del valor obtenido, un valor obtenido mediante la adición de GBP no marcada (SIGMA-ALDRICH INC.) A una concentración final de 20 μ M al presente ensayo se restó como el derivado de una adsorción no específica, y el valor obtenido se usó como el nivel de unión específica de ^3H -GBP a Cacna2d1 (unidad: "cuenta").

b) Detección de las actividades inhibitoras de la reacción unión Cacna2d1/GBP de los compuestos de ensayo

Cada compuesto de ensayo se añadió a diversas concentraciones al ensayo de detección de reacción de unión Cacna2d1/GBP construido en el apartado a), y el nivel de unión se midió mediante el procedimiento descrito en el apartado a). A continuación, definiendo el nivel de unión específica Cacna2d1/GBP obtenido mediante la adición del compuesto a una concentración de x nM como "nivel de unión [x]" y tasa de inhibición de unión Cacna2d1/GBP correspondiente como "tasa de inhibición [x]", la tasa de inhibición (%) se determinó en base a la ecuación siguiente:

$$\text{Tasa de inhibición [x] (\%)} = (1 - (\text{nivel de unión [x]} / \text{nivel de unión [0]})) \times 100$$

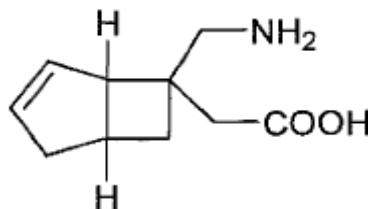
en la que

el nivel de unión [0] se refiere al nivel de la unión de ^3H -GBP obtiene sin la adición del compuesto.

La tasa de inhibición se representó en función de la concentración. A partir de este resultado, se calculó un "valor CI_{50} ", que es la concentración del compuesto de ensayo necesaria para inhibir el 50% de la unión Cacna2d1/GBP.

(Ejemplo de producción 1)

Ácido [6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

**(1-a) Ácido (2E)-hepta-2,6-dienoico**

Se disolvieron 4-pentenal (4,45 g, 51,4 mmol) y ácido malónico (6,41 g, 61,6 mmol) en piridina (9,9 ml). A la solución se añadió piperidina (1,9 ml) y, a continuación, la mezcla se agitó a 90°C durante 5 horas. La mezcla se dejó enfriar y, a continuación, se hizo ácida mediante la adición de ácido clorhídrico 2 N, seguido de extracción con éter dietílico. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y, a continuación, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se destiló a presión reducida para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa incoloro (3 mmHg, 110-116°C, 3,27 g, 50%). ¹H-RMN (400 MHz; CDCl₃): δ ppm: 2,21-2,26 (2H, m), 2,32-2,37 (2H, m), 5,01-5,08 (2H, m), 5,75-6,87 (2H, m), 7,03-7,11 (1H, m).

(1-b) Biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-ilidenacetato de tert-butilo

Se añadió, gota a gota, cloruro de oxalilo (10 ml) a una solución de ácido (2E)-hepta-2,6-dienoico (3,27 g, 25,9 mmol) en tolueno (60 ml) bajo enfriamiento con hielo. La mezcla se agitó durante 20 minutos, a continuación, se retiró del baño agua helada, y se calentó gradualmente a temperatura ambiente. Después de agitar durante 50 minutos, la solución de reacción se agitó durante 1 hora bajo calentamiento a reflujo. La solución se dejó enfriar y, a continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadió además tolueno y, a continuación, el disolvente se separó por destilación de nuevo a presión reducida. El residuo se disolvió en tolueno (20 ml), y esta solución se añadió gota a gota durante 1 hora a una solución de trietilamina (9,19 g, 91 mmol) en tolueno (20 ml) calentada previamente a 90°C. Tras completar la adición gota a gota, la mezcla se calentó adicionalmente con agitación durante 2 horas. La solución de reacción se enfrió, a continuación se diluyó con solución salina saturada y agua, y se filtró a través de Celite. El filtrado se separó en capas orgánica y acuosa. A continuación, la capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico 1 N, a continuación se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. El filtrado se añadió a una solución de reacción preparada previamente a partir de una solución de dimetoxifosforilacetato de tert-butilo (5,98 g, 25,9 mmol) en dimetoxietano (20 ml) e hidruro de sodio (> 65% de aceite, 986,7 mg, 25,9 mmol), y la mezcla se agitó durante 1,5 horas. A la solución de reacción se añadieron una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, solución salina saturada y agua, en este orden, y la solución de reacción se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y, a continuación, se filtró. El disolvente se separó por destilación a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo pálido (1,73 g, 32%, mezcla E/Z).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm:

Isómero principal: 1,45 (9H, s), 2,29-2,35 (1H, m), 2,62-2,71 (2H, m), 2,89-2,98 (1H, m), 3,27-3,35 (1H, m), 3,92 (1H, ancho), 5,47-5,49 (1H, m), 5,80-5,87 (2H, m).

Isómero menor: 1,49 (9H, s), 2,42-2,48 (1H, m), 2,62-2,71 (2H, m), 2,89-2,98 (2H, m), 4,34-4,36 (1H, m), 5,37-5,38 (1H, m), 5,61-5,64 (2H, m).

(1-c) [6-(nitrometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo

Se disolvió biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-ilidenacetato de tert-butilo (1,73 g, 8,39 mmol) en nitrometano (10 ml). A la solución se añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (1,3 ml, 8,4 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y, a continuación, se calentó con agitación a entre 50 y 60°C durante 5 horas. La mezcla se dejó enfriar y, a continuación, se diluyó con ácido clorhídrico 1 N y solución salina saturada, seguido de extracción con acetato de etilo. A continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa incoloro (1,98 g, 89%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 1,45 (9H, s), 1,53 (1H, dd, J=7,5, 12,9 Hz), 2,17 (1H, d, J=15,2 Hz), 2,31 (1H, ddd, J=2,4, 8,6, 12,1 Hz), 2,47 (2H, s), 2,52-2,58 (1H, m), 2,87 (1H, quint, J=7,5 Hz), 3,25-2,66 (1H, m), 4,78 (1H, d, J=11,4 Hz), 4,87 (1H, d, J=11,4 Hz), 5,65-5,67 (1H, m), 5,95 (1H, dd, J=1,6, 5,9 Hz).

(1-d) [6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo

- 5 Se disolvió [6-(nitrometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (1,98 g, 7,41 mmol) en etanol (20 ml) y agua (10 ml). A la solución se añadieron polvo de hierro (2,07 g, 37,0 mmol) y cloruro de amonio (392,7 mg, 7,41 mmol), y la mezcla se agitó durante 4,5 horas con calentamiento a reflujo. La mezcla se dejó enfriar, a continuación se diluyó con solución salina saturada, una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y acetato de etilo, y se filtró a través de Celite para eliminar la materia insoluble. El filtrado se separó en capas orgánica y acuosa. La capa orgánica se lavó con
- 10 solución salina saturada y, a continuación, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener el compuesto de interés como un sólido amarillo pálido (1,99 g, este compuesto se usó directamente en la siguiente reacción sin ser purificado).

- 15 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 1,39-1,49 (1H, m), 1,44 (9H, s), 1,97 (1H, ddd, J=2,8, 9,0, 11,7 Hz), 2,14 (1H, dd, J=2,3, 16,8 Hz), 2,25 (1H, d, J=13,7 Hz), 2,32 (1H, d, J=13,7 Hz), 2,47-2,55 (1H, m), 2,75 (1H, quint, J=7,4 Hz), 2,88 (2H, s), 2,98-2,99 (1H, m), 5,77-5,79 (1H, m), 5,87-5,89 (1H, m).

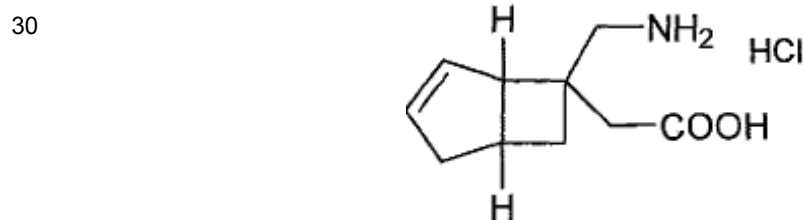
(1-e) Ácido [6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

- 20 Se añadió una solución 4 N de ácido clorhídrico en acetato de etilo (10 ml) a [6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (0,99 g, 4,17 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se suspendió mediante la adición de diclorometano. A continuación, se añadió gota a gota trietilamina a la suspensión y el polvo resultante se recogió por filtración. El polvo obtenido se lavó con diclorometano y, a continuación, se secó a presión reducida para obtener el compuesto de interés como un polvo blanco (211,6 mg, 35%).

- 25 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 1,49 (1H, dd, J=7,6, 12,5 Hz), 2,06 (1H, ddd, J=2,6, 7,6, 12,5 Hz), 2,17 (1H, dd, J=2,6, 16,8 Hz), 2,49 (2H, s), 2,48-2,56 (1H, m), 2,86 (1H, quint, J=7,6 Hz), 3,15-3,16 (1H, m), 3,18 (1H, d, J=12,7 Hz), 3,22 (1H, d, J=12,7 Hz), 5,75-5,78 (1H, m), 5,91-5,93 (1H, m).

(Ejemplo de producción 2)

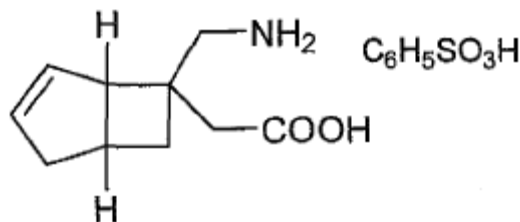
Clorhidrato de ácido [6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético



- 40 Se añadieron agua (5 ml) y una solución 4 N de ácido clorhídrico en 1,4-dioxano (22 ml) a ácido 6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético (320,2 mg, 1,77 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. El disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadió 1,4-dioxano, y la mezcla se calentó y, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. El polvo resultante se recogió por filtración. El polvo obtenido se lavó con 1,4-dioxano y, a continuación, se secó para obtener el compuesto de interés como un polvo blanco (350,0 mg, 92%). ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ ppm: 1,51 (1H, dd, J=7,6, 12,7 Hz), 2,16 (1H, ddd, J=2,8, 7,6, 15,6 Hz), 2,19 (1H, dd, J=2,2, 16,8 Hz), 2,51 (2H, s), 2,53-2,59 (1H, m), 2,89 (1H, quint, J=7,6 Hz), 3,18-3,19 (1H, m), 3,33 (1H, d, J=13,3 Hz), 3,37 (1H, d, J=13,3 Hz), 5,70-5,73 (1H, m), 5,97-6,00 (1H, m).

(Ejemplo de producción 3)

- 45 Bencenosulfonato de ácido [6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

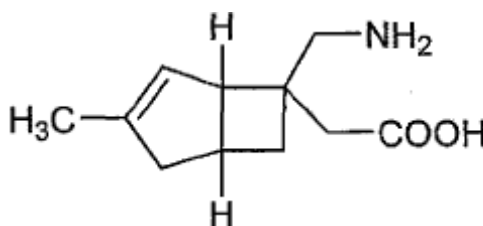


Se disolvió ácido 6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético (152,2 g, 391 mmol) en 2-propanol (7,5 ml) y agua (2,6 ml). A la solución se añadió a continuación monohidrato de ácido benzenosulfónico (305,2 mg, 1,73 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. El disolvente se separó por destilación a presión reducida, seguido de deshidratación azeotrópica adicional con 2-propanol. A continuación, el residuo se lavó con 2-propanol para obtener el compuesto de interés como un polvo blanco (260,4 mg, 55%).

^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ ppm: 1,51 (1H, dd, $J=7,4$, 12,7 Hz), 2,12-2,21 (2H, m), 2,51 (2H, s), 2,51-2,59 (1H, m), 2,89 (1H, quint, $J=7,4$ Hz), 3,17-3,18 (1H, m), 3,32 (1H, d, $J=13,3$ Hz), 3,36 (1H, d, $J=13,3$ Hz), 5,69-5,71 (1H, m), 5,97-6,00 (1H, m), 7,40-7,46 (3H, m), 7,80-7,84 (2H, m).

(Ejemplo de producción 4)

Ácido [6-aminometil-3-metilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético



(4-a) Se añadió hidruro sódico de 4-metil-3-hidroxihept-6-enoato de metilo (>63% aceite, 1,64 g, 43,1 mmol) a una solución de 3-oxopentanoato de metilo (5,10 g, 39,2 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla se agitó en este estado durante 10 minutos. A la solución de reacción, se añadió gota a gota *n*-butil-litio (solución 1,66 M en hexano, 25,9 ml, 43,1 mmol), y la mezcla se agitó adicionalmente durante 10 minutos bajo enfriamiento con hielo. A continuación, se añadió bromuro de alilo (5,18 g, 43,1 mmol) a la misma, y la mezcla se agitó en este estado durante 30 minutos y, a continuación, se agitó adicionalmente durante una noche a temperatura ambiente. A la solución de reacción se añadieron ácido clorhídrico 1 N y solución salina saturada, seguido de extracción con éter dietílico. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en metanol (100 ml). A la solución se añadió borohidruro de sodio (1,89 g, 50 mmol) bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla se agitó en este estado durante 1,5 horas. Se añadió ácido clorhídrico 2 N (50 ml) a la misma, y la mezcla se agitó durante 30 minutos. A continuación, se añadió solución salina saturada a la misma, seguido de extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y, a continuación, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo pálido (5,72 g, 85%, mezcla de diastereómeros).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: 0,89-0,94 (3H, m), 1,58-1,75 (1H, m), 1,91-2,03 (1H, m), 2,21-2,33 (1H, m), 2,43-2,56 (2H, m), 3,72 (3H, s), 3,84-4,00 (1H, m), 5,01-5,07 (2H, m), 5,74-5,84 (1H, m).

(4-b) Ácido 4-metil-3-hidroxihept-6-enoico

Se disolvió 4-metil-3-hidroxihept-6-enoato de metilo (5,72 g, 33,2 mmol) en una solución 2 N de hidróxido de potasio en metanol (50 ml), y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A partir de la solución de reacción, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadió a continuación una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N, seguido de extracción con éter dietílico. La capa acuosa se hizo ácida mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado bajo enfriamiento con hielo, seguido de extracción con éter dietílico de nuevo. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se

separó por destilación a presión reducida para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo (2,21 g, 42%, mezclas de diastereómeros).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 0,90-0,94 (3H, m), 1,64-1,74 (1H, m), 1,93-2,00 (1H, m), 2,24-2,32 (1H, m), 2,45-2,61 (2H, m), 3,87-4,03 (1H, m), 5,03-5,08 (2H, m), 5,75-5,83 (1H, m).

5 (4-c) 3-metilbicio[3.2.0]hept-3-en-6-ilidenacetato de tert-butilo

Se disolvió ácido 4-metil-3-hidroxihept-6-enoico (2,21 g, 13,9 mmol) en anhídrido acético (14 ml). A la solución se añadió acetato de potasio (3,29 g, 33,4 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se calentó a entre 110 y 120°C y se agitó durante 3,5 horas. A la solución de reacción se añadieron a continuación agua con hielo y tolueno, y esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se separó en capas acuosa y orgánica mediante la adición de solución salina saturada y tolueno. A continuación, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N y solución salina saturada, en este orden, a continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y, a continuación, se filtró. El filtrado se añadió a una solución de reacción preparada mediante la adición de hidruro de sodio (>63% aceite, 533,3 mg, 14,0 mmol) a una solución de dimetoxifosforilacetato de tert-butilo (3,24 g, 14,5 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1,5 horas. La solución de reacción se separó en capas acuosa y orgánica mediante la adición de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y solución salina saturada. La capa acuosa se sometió a extracción con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, a continuación se lavaron con solución salina saturada y, a continuación, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo pálido (1,21 g, 40%, mezcla E/Z).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm:

Isómero principal: 1,45 (9H, s), 2,11-2,22 (4H, m), 2,59-2,71 (2H, m), 2,87-2,97 (1H, m), 3,26-3,34 (1H, m), 3,87 (1H, ancho), 5,22-5,23 (1H, m), 5,45-5,47 (1H, m).

Isómero menor: 1,49 (9H, s), 2,11-2,21 (4H, m), 2,43-2,46 (1H, m), 2,59-2,70 (1H, m), 2,75-2,83 (1H, m), 2,87-2,97 (1H, m), 4,29 (1H, ancho), 5,36 (1H, s), 5,59 (1H, s).

(4-d) [3-metil-6-(nitrometil)bicio[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo

Se disolvió 3-metilbicio[3.2.0]hept-3-en-6-ilidenacetato de tert-butilo (1,21 g, 5,50 mmol) en nitrometano (7 ml). A la solución se añadió 1,8-diazabicio[5.4.0]undec-7-eno (0,91 ml, 6,0 mmol), y la mezcla se calentó con agitación a entre 50 y 60°C durante 6 horas. La mezcla se dejó enfriar y, a continuación, se añadió una solución acuosa saturada de dihidrogenofosfato de potasio a la misma, seguido de extracción con acetato de etilo. A continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa incolora (1,14 g, 74%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 1,45 (9H, s), 1,53 (1H, dd, J=7,6, 12,9 Hz), 1,80 (3H, s), 2,04 (1H, d, J=16,4 Hz), 2,29 (1H, ddd, J=2,8, 7,6, 12,9 Hz), 2,47 (2H, s), 2,49 (1H, dd, H=7,6, 16,4 Hz), 2,86 (1H, quint, J=7,6 Hz), 3,21-3,22 (1H, m), 4,74 (1H, d, J=11,7 Hz), 4,84 (1H, J=13,7 Hz), 5,25 (1H, s).

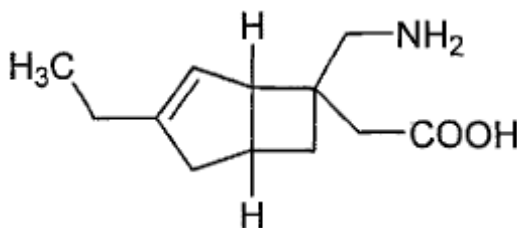
(4-e) [6-aminometil-3-metilbicio[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo

Se disolvió [3-metil-6-(nitrometil)bicio[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (1,12 g, 3,99 mmol) en etanol (20 ml) y agua (10 ml). A la solución se añadieron polvo de hierro (892,8 mg, 15,9 mmol) y cloruro de amonio (211,5 mg, 3,99 mmol), y la mezcla se agitó durante 4 horas con calentamiento a reflujo. La mezcla se dejó enfriar, a continuación se diluyó con solución salina saturada, una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y acetato de etilo, y se filtró a través de Celite para eliminar la materia insoluble. El filtrado se separó en capas orgánica y acuosa. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada, a continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y, a continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadió una solución 4 N de ácido clorhídrico en acetato de etilo (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se suspendió en diclorometano. A la suspensión se añadió gota a gota trietilamina, y el polvo resultante se recogió por filtración, a continuación se lavó con diclorometano y, a continuación, se secó para obtener el compuesto de interés como un polvo blanco (105,8 mg, 28%).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ ppm: 1,40 (1H, dd, J=7,6, 12,3 Hz), 1,79 (3H, s), 2,02-2,08 (2H, m), 2,43-2,50 (1H, m), 2,45 (1H, d, J=16,2 Hz), 2,51 (1H, d, J=16,2 Hz), 2,85 (1H, quint, J=7,6 Hz), 3,05-3,12 (1H, m), 3,13 (1H, d, J=13,0 Hz), 3,17 (1H, d, J=13,0 Hz), 5,36 (1H, t, J=1,6 Hz).

(Ejemplo de producción 5)

Ácido [6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

**(5-a) 4-etil-3-hidroxihept-6-enoato de etilo**

Se añadió hidruro de sodio (>63% aceite, 2,09 g, 55 mmol) a una solución de 3-oxohexanoato de etilo (7,91 g, 50 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla se agitó en este estado durante 10 minutos. A la solución de reacción se añadió gota a gota n-butil-litio (solución 1,58 M en hexano, 34,8 ml, 55 mmol), y la mezcla se agitó adicionalmente durante 10 minutos bajo enfriamiento con hielo. A continuación, se añadió bromuro de alilo (4,7 ml, 55 mmol) a la misma, y la mezcla se agitó en este estado durante 1 hora y, a continuación, se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 4 horas. A la solución de reacción se añadieron ácido clorhídrico 1 N y una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, seguido de extracción con n-pentano. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en etanol (80 ml). A la solución se añadió borohidruro de sodio (1,51 g, 40 mmol) bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla se agitó en este estado durante 2 horas. Se añadió ácido clorhídrico 1 N (50 ml) a la misma, y la mezcla se agitó durante 30 minutos. A continuación, se añadió solución salina saturada a la misma, seguido de extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y, a continuación, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo pálido (3,64 g, 37%, mezcla de diastereómeros).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 0,91 (3H, t, J=7,5 Hz), 1,28 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,43-1,55 (2H, m), 1,98-2,28 (2H, m), 2,45-2,48 (2H, m), 2,88-2,93 (1H, m), 4,07-4,10 (1H, m), 4,10-4,20 (2H, m), 5,01-5,09 (2H, m), 5,75-5,86 (1H, m).

(5-b) Ácido 4-etil-3-hidroxihept-6-enoico

Se disolvió 4-etil-3-hidroxihept-6-enoato de etilo (3,64 g, 18,2 mmol) en una solución 2 N de hidróxido de potasio en metanol (120 ml), y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A partir de la solución de reacción, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadió a continuación una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 N (200 ml), seguido de extracción con éter dietílico. La capa acuosa se hizo ácida mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado bajo enfriamiento con hielo, seguido de extracción con éter dietílico de nuevo. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo pálido (3,14 g, <100%, mezcla de diastereómeros).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 0,91 - 0,96 (3H, m), 1,39-1,52 (3H, m), 2,1 a 2,28 (2H, m), 2,52-2,55 (2H, m), 4,5 a 4,15 (2H, m), 5,3 a 5,10 (2H, m), 5,74-5,86 (1H, m).

(5-c) 3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-ilidenacetato de tert-butilo

Se disolvió ácido 4-etil-3-hidroxihept-6-enoico (3,13 g, 18,2 mmol) en anhídrido acético (15 ml). A la solución se añadió acetato de potasio (4,27 g, 43,6 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 100 minutos. La solución de reacción se calentó a reflujo y se agitó durante 3,5 horas para formar "3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-ona" en la solución de reacción. A la solución de reacción se añadieron a continuación agua con hielo y tolueno, y esta mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se separó en capas acuosa y orgánica mediante la adición de solución salina saturada (50 ml) y tolueno (20 ml). A continuación, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa 1 N de hidróxido de sodio y solución salina saturada, en este orden, a continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se añadió a una solución de reacción preparada mediante la adición de hidruro de sodio (> 65% aceite, 761,9 mg, 20 mmol) a una solución de dimetoxifosforilacetato de tert-butilo (4,48 g, 20 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 hora.

La solución de reacción se separó en capas acuosa y orgánica mediante la adición de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y solución salina saturada. La capa acuosa se sometió a extracción con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, a continuación se lavaron con solución salina saturada y, a continuación, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color amarillo pálido (1,32 g, 31%, mezcla E/Z).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ ppm:

Isómero principal: 1,06 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,45 (9H, s), 2,07-2,22 (3H, m), 2,59-2,70 (2H, m), 2,87-2,96 (1H, m), 3,30 (1H, ddt, $J=8,6, 18,4, 2,7$ Hz), 3,86-3,88 (1H, m), 5,22-5,23 (1H, m), 5,45-5,47 (1H, m).

Isómero menor: 1,08 (3H, t, $J=7,3$ Hz), 1,49 (9H, s), 2,07-2,21 (3H, m), 2,43-2,47 (1H, m), 2,59-2,70 (1H, m), 2,75-2,85 (1H, m), 2,87-2,96 (1H, m), 4,28-4,31 (1H, m), 5,35-5,38 (1H, m), 5,45-5,47 (1H, m).

(5-d) [3-etil-6-(nitrometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il] acetato de tert-butilo

Se disolvió [3-etilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-ilidenacetato de tert-butilo (1,32 g, 5,63 mmol) en nitrometano (7 ml). A la solución se añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (1,2 ml, 7,3 mmol), y la mezcla se calentó con agitación a entre 50 y 60°C durante 7 horas. La mezcla se dejó enfriar y, a continuación, se añadió una solución acuosa saturada de dihidrogenofosfato de potasio a la misma, seguido de extracción con acetato de etilo. A continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa incolora (1,39 g, 84%).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: 1,09 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,46 (9H, s), 1,52 (1H, dd, $J=7,6, 13,2$ Hz), 2,06 (1H, d, 16,6 Hz), 2,14 (2H, q, $J=7,4$ Hz), 2,30 (1H, ddd, $J=2,4, 7,6, 13,2$ Hz), 2,47 (2H, s), 2,49 (1H, dd, $J=7,6, 16,6$ Hz), 2,86 (1H, quint, $J=7,6$ Hz), 3,21-3,22 (1H, m), 4,75 (1H, d, $J=11,7$ Hz), 4,84 (1H, d, $J=11,7$ Hz), 5,27 (1H, s).

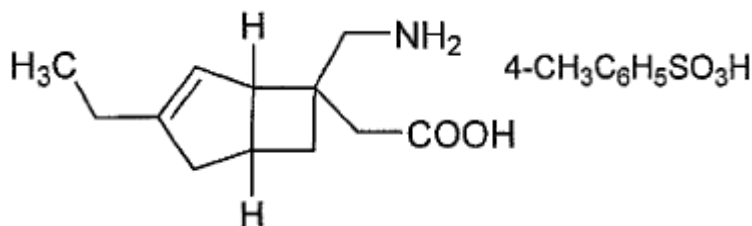
(5-e) Ácido [6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

Se disolvió [3-etil-6-(nitrometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il] acetato de tert-butilo (1,09 g, 4,71 mmol) en etanol (10 ml) y agua (5 ml). A la solución se añadieron polvo de hierro (1,32 g, 23,5 mmol) y cloruro de amonio (249,6 mg, 4,71 mmol), y la mezcla se agitó durante 2 horas con calentamiento a reflujo. La mezcla se dejó enfriar, a continuación se diluyó con solución salina saturada, una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y acetato de etilo, y se filtró a través de Celite para eliminar la materia insoluble. El filtrado se separó en capas orgánica y acuosa. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada y, a continuación, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y, a continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadió una solución 4 N de ácido clorhídrico en acetato de etilo (20 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se suspendió en diclorometano. A la suspensión se añadió gota a gota trietilamina, y el polvo resultante se recogió por filtración, a continuación se lavó con diclorometano y, a continuación, se secó para obtener el compuesto de interés como un polvo blanco (425,1 mg, 43%).

^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ ppm: 1,10 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,48 (1H, dd, $J=7,5, 12,5$ Hz), 2,03-2,08 (2H, m), 2,14 (2H, q, $J=7,4$ Hz), 2,46 (1H, d, $J=16,2$ Hz), 2,46-2,53 (1H, m), 2,51 (1H, d, $J=16,2$ Hz), 2,85 (1H, quint, $J=7,5$ Hz), 3,09-3,10 (1H, m), 3,14 (1H, d, $J=13,0$ Hz), 3,18 (1H, d, $J=13,0$ Hz), 5,38 (1H, dd, $J=1,7, 3,7$ Hz).

(Ejemplo de producción 6)

P-toluenosulfonato de ácido [6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-5-il]acético

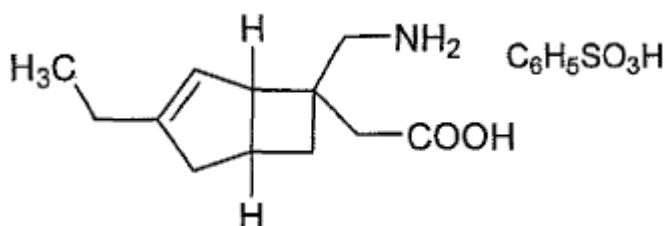


Se disolvió [6-(tert-butoxicarbonilamino)metil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (1.152,23 g, 391,6 mmol) en benceno (1,2 l). A la solución se añadieron a continuación tioanisol (145,57 g, 1.173 mmol) y monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (89,39 g) y la mezcla se agitó durante 2 horas a reflujo. La mezcla se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente, y el polvo resultante se recogió por filtración. El polvo obtenido se lavó con acetato de etilo y, a continuación, se secó para obtener el compuesto de interés como un polvo blanco (88,29 g, 59%).

^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ ppm: 1,11 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,51 (1H, dd, 7,4, 12,7 Hz), 2,06-2,20 (4H, m), 2,37 (3H, s), 2,49-2,56 (1H, m), 2,51 (2H, s), 2,87 (1H, quint, $J=7,4$ Hz), 3,12-3,14 (1H, m), 3,28 (1H, d, $J=13,5$ Hz), 3,33 (1H, d, $J=13,5$ Hz), 5,31-5,32 (1H, m), 7,21-7,25 (2H, m), 7,69-7,72 (2H, m).

(Ejemplo de producción 7)

Bencenosulfonato de ácido [6-(aminometil)-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

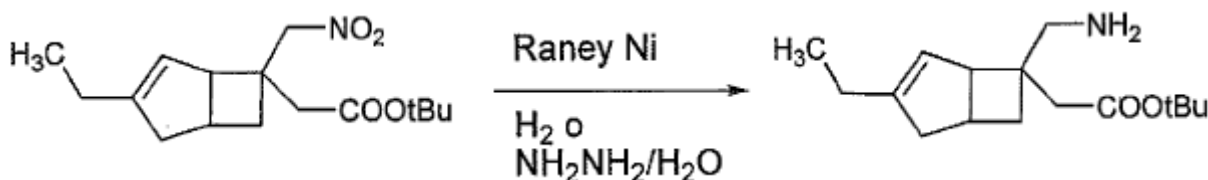


Se disolvió ácido 6-(aminometil)-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético (4,50 g, 20,6 mmol) con calentamiento en una solución acuosa 1 M de monohidrato de ácido benzenosulfónico (22,7 ml) y, a continuación, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido resultante se recogió por filtración. El sólido se lavó con agua (15 ml) y, a continuación, se secó usando una bomba de vacío para obtener el compuesto de interés como un sólido incoloro (6,45 g, 77%). ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ ppm: 1,11 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,50 (1H, dd, $J=7,5$, 12,6 Hz), 2,08 (1H, d, 16,5 Hz), 2,10-2,20 (3H, m), 2,46-2,56 (3H, m), 2,87 (1H, quint, $J=7,5$ Hz), 3,12-3,13 (1H, m), 3,28 (1H, d, $J=13,4$ Hz), 3,33 (1H, d, $J=13,4$ Hz), 5,31 (1H, d, $J=1,8$ Hz), 7,39-7,45 (3H, m), 7,80-7,85 (2H, m).

(Etapas de reducción de un grupo nitro)

(Ejemplo de producción 8)

[6-(aminometil)-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo



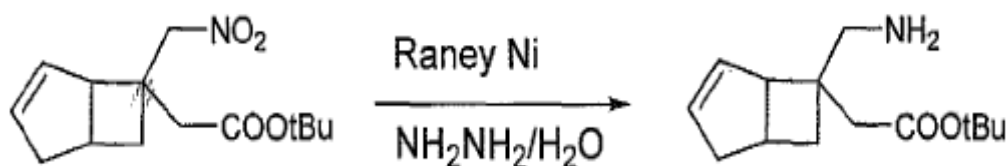
(i) Se añadieron níquel Raney (102,3 g, 0,15 p/p) y etanol (5,5 l, 8,0 v/p) a [3-etil-6-(nitrometil)bicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (709,0 g, neto: 681,8 g, 2,31 mol, mezcla diastereomérica 85:15), y la mezcla se agitó. A la solución de reacción se añadió monohidrato de hidrazina (458,0 ml, 9,23 mol, 4,00 eq.), y la mezcla se agitó a 40°C durante 2 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el níquel Raney se separó por filtración. A continuación, el disolvente se separó por destilación para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color pardo (637,0 g, neto: 552,3 g, rendimiento: 90,2%, mezcla diastereomérica 85:15).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: 1,05-1,10 (cada t), 1,44-1,61 (m), 1,86-2,38 (m), 2,42-2,55 (m), 2,73-3,05 (m), 5,40-5,48 (m).

(ii) Se añadieron níquel Raney (96 mg, 0,16 p/p) y etanol (200 μl) a [3-etil-6-(nitrometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (59 mg, mezcla diastereomérica 85:15), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas bajo la atmósfera de hidrógeno. El níquel Raney se separó por filtración. A continuación, el disolvente se separó por destilación para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa de color marrón (49 mg, rendimiento: 92%, mezcla diastereomérica 85:15).

(Ejemplo de producción 9)

[6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo



Se añadieron níquel Raney (0,4 g) y etanol (24 ml) a [6-(nitrometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (4,0 g, mezcla de diastereoisómeros 90:10), y la mezcla se agitó. A la solución de reacción se añadió monohidrato de hidrazina (2,9 ml), y la mezcla se agitó durante 0,5 horas. El consumo de los materiales de partida se confirmó mediante cromatografía de capa fina y el níquel Raney se separó por filtración. El disolvente se separó por destilación para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa marrón (3,62 g, mezcla de diastereoisómeros 90:10).

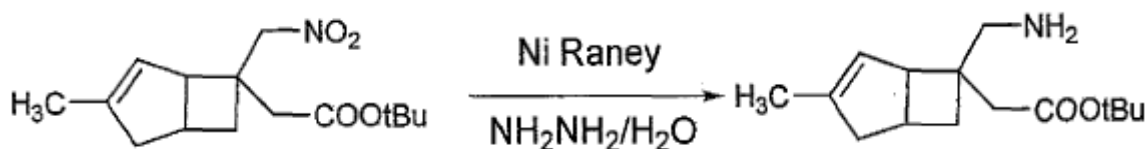
Desarrollador de cromatografía de capa fina: hexano:acetato de etilo = 9:1

valor R_f de la forma nitro: 0,7, valor R_f de la forma reducida: 0,1 (con colas)

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: 1,44-1,51 (m), 1,93-2,17 (m), 2,23-2,35 (m), 2,48-2,60 (m), 2,70-2,90 (m), 2,95-3,30 (m), 5,75-5,80 (m), 5,83-5,90 (m).

(Ejemplo de producción 10)

[6-(aminometil)-3-metilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo



Se añadieron níquel Raney (0,28 g) y etanol (20 ml) a [6-(nitrometil)-3-metilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (2,81 g, mezcla diastereomérica 90:10), y la mezcla se agitó. A la solución de reacción se añadió monohidrato de hidrazina (1,9 ml), y la mezcla se agitó durante 0,75 horas. El consumo de los materiales de partida se confirmó mediante cromatografía de capa fina y el níquel Raney se separó por filtración. El disolvente se separó por destilación para obtener el compuesto de interés como una sustancia aceitosa marrón (2,50 g, mezcla de diastereoisómeros 90:10).

Desarrollador de cromatografía de capa fina: hexano:acetato de etilo = 9:1

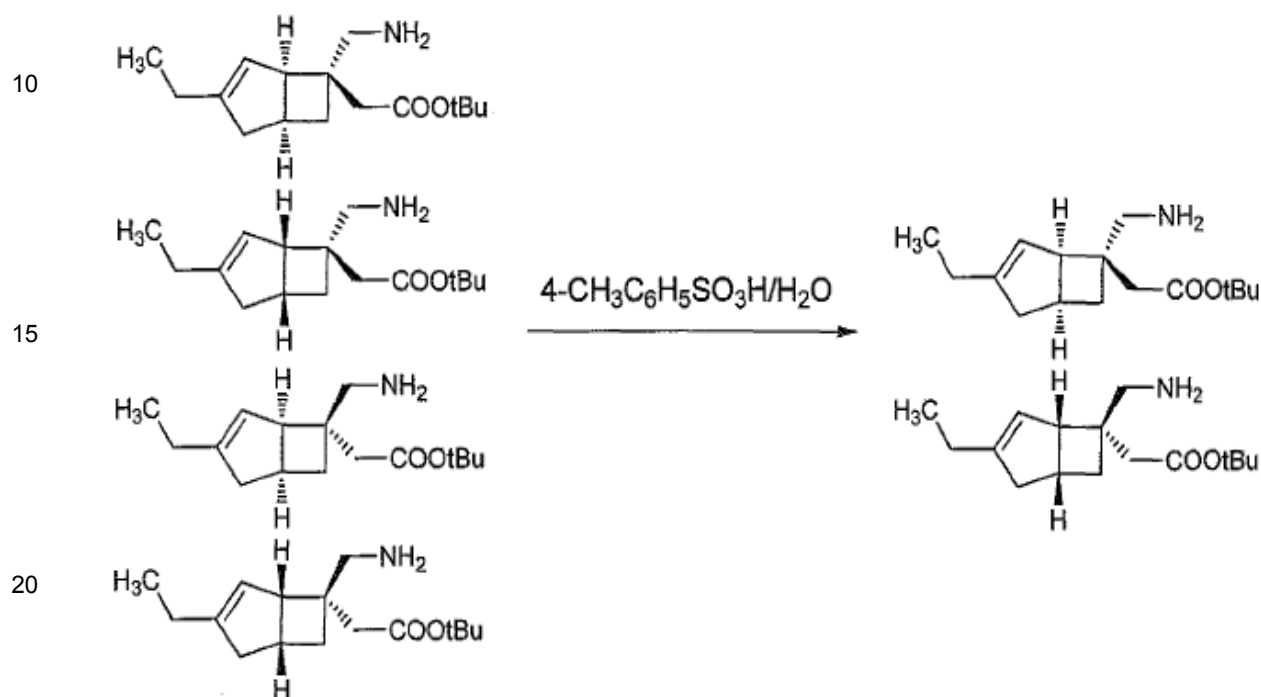
Valor R_f de la forma nitro: 0,7, valor R_f de la forma reducida: 0,1 (con colas)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm: 1,44-1,61 (m), 1,80-1,90 (m), 1,93-2,06 (m), 2,10-2,20 (m), 2,23-2,38 (m), 2,40-2,60 (m), 2,73-2,90 (m), 2,92-3,30 (m), 5,40-5,45 (m).

(Etapas de resolución de diastereómeros)

5 (Ejemplo de producción 11)

P-toluenosulfonato [(1R*,5S*,6S*)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo



Se añadió acetato de etilo (70 ml, 10,4 v/p) a [6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (7,8 g, pureza: 86,7%, 22,03 mmol, mezcla diastereomérica 87:13), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de la adición de monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (4,2 g, 22,03 mmol, 0,87 eq.), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, y se recogió un cristal por filtración. A continuación, el cristal se secó a presión reducida bajo la condición de 40°C para obtener p-toluenosulfonato de [(1R*,5S*,6S*)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo como un cristal blanco (7,8 g, rendimiento: 80,6%, relación diastereomérica: 99,7:0,3).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm: 1,04 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,31-1,40 (1H, m), 1,40 (9H, s), 1,98-2,15 (4H, m), 2,25 (3H, s), 2,25-2,50 (3H, m), 2,76 (1H, quint, J=7,4 Hz), 3,05-3,18 (3H, m), 3,35 (1H, br s), 5,20-5,22 (1H, m), 7,10-7,12 (2H, m), 7,45-7,48 (2H, m), 7,74 (1H, br s). Calculado anal. para C₂₃H₃₅NO₅S: C, 63,13; H, 8,06; N, 3,20; S, 7,33; Obtenido: C, 63,10; H, 8,14; N, 3,29; S, 7,30.

Condiciones del análisis GC (medición de la relación diastereomérica) Columna: CP-Sil 8CB para amina (GL Science, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)

Detector: FID

Temperatura: horno de columna (130°C), la inyección (250°C), detector (250°C)

Condiciones de temperatura: (i) 130°C (5,5 min), (ii) 130-270°C (10°C/min), (iii) 270°C (4,5 min)

Caudal: 1,5 ml/min (velocidad lineal media: 38 cm/seg)

Relación de división: 1/10

Gas portador: helio

Tiempo de análisis: 25 min

Corte de pico: 0,0-2,0 min

5 Tiempo de retención: 13,8 min, 14,0 min

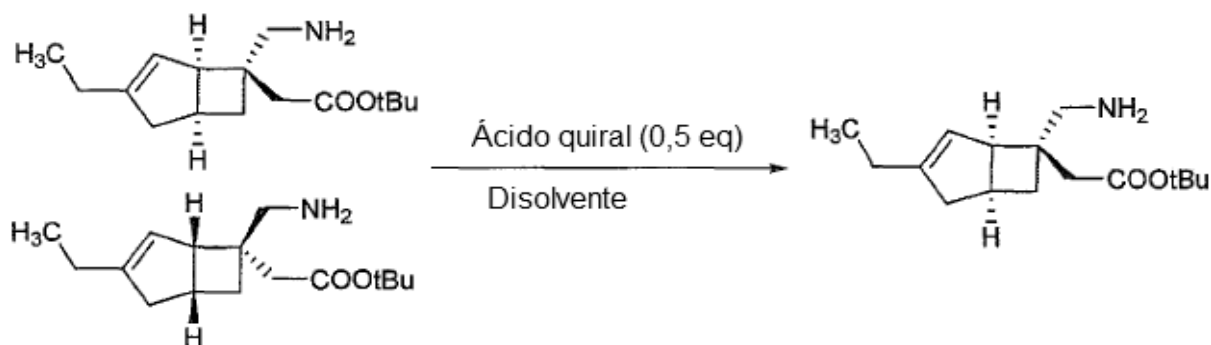
(Etapa de resolución óptica)

(Ejemplo de producción 12)

Carboxilato de [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il] acetato de tert-butilo (carboxilato ópticamente activo)

10

15



20

25

Se suspendió p-toluenosulfonato de [(1R*,5S*,6S*)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo en acetato de etilo (20 v/p). La suspensión se separó en capas acuosa y orgánica mediante la adición de una solución acuosa de bicarbonato sódico (4 v/p) para obtener la forma libre de [(1R*,5S*,6S*)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo. A este [(1R*,5S*,6S*)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (200 mg, 0,754 mmol), se añadieron éter diisopropílico (IPE) o acetonitrilo (MeCN) (1,0 ml, 5,0 v/p) y, a continuación, ácido carboxílico ópticamente activo (0,5 eq.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. El cristal depositado se filtró y se lavó con el disolvente (0,5 ml, 2,5 v/p) que se utiliza. El cristal obtenido se secó a presión reducida para obtener la forma de sal correspondiente al rendimiento y a la pureza óptica mostrados en la Tabla 1 a continuación.

30

La pureza óptica se analizó mediante la conversión de la sal obtenida a la forma libre con una solución acuosa de bicarbonato sódico y, a continuación, mediante la derivación de la forma libre a una forma de 3,5-dinitrobenzoilo.

Condiciones del análisis HPLC (medición de pureza óptica, analizada después de la derivación a la forma de 3,5-dinitrobenzoilo)

Columna: CHIRALPAK AS-RHx2 (Daisel, 4,6 mmx150 mm, 5 µm) Detección: 220 nm, Temperatura de la columna: 40°C, Caudal: 0,8 ml/min

35

Fase móvil: MeCM / tampón de fosfato 5 mM (pH 7,0) = 55/45

Tiempo de retención: 29,6 min, 31,8 min, 36,1 min

40

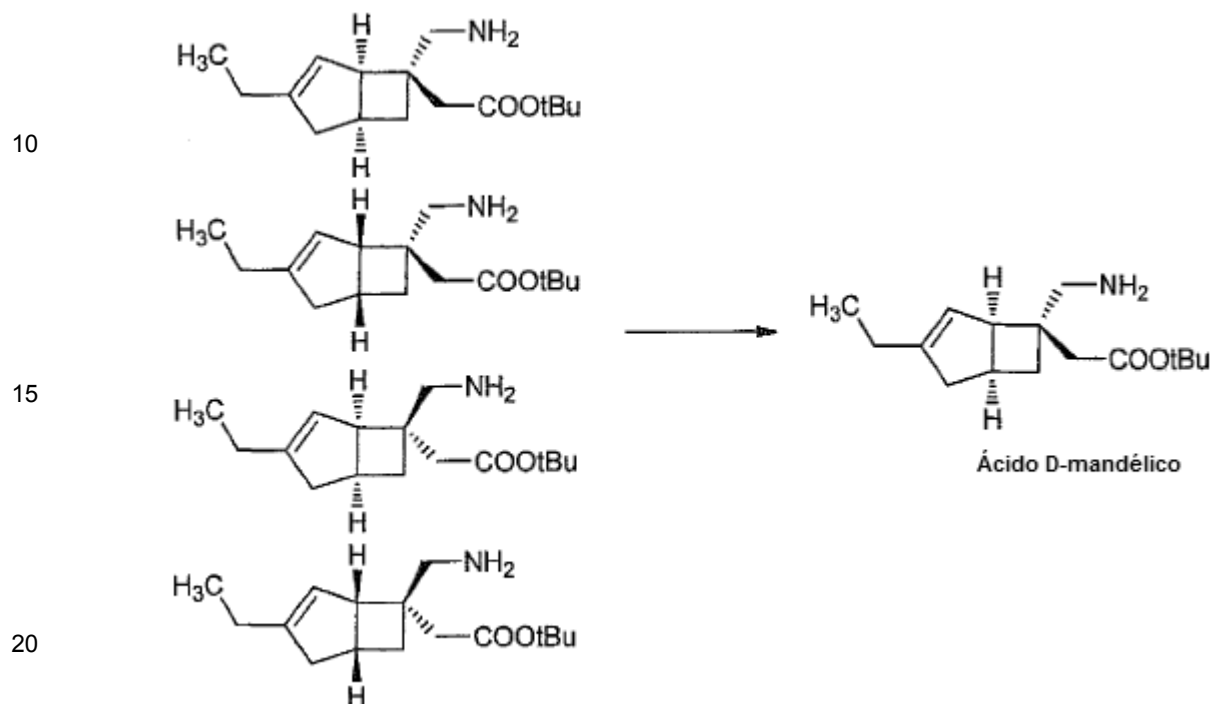
(Tabla 1)

Entrada	Ácido quiral	IPE		MeCN	
		Rend.(%)	e.e.(%)	Rend.(%)	e.e.(%)
1	Ácido D-mandélico	42,1	64,3 (1R)	32,4	96,1 (1R)
2*	Ácido L-mandélico	42,8	59,2 (1S)	30,4	97,3 (1S)
3*	Ácido Di-p-toluoil-L-tartárico	15,2	66,8 (1R)	26,6	26,1 (1R)
4*	N-Boc-L-prolina	33,6	56,9 (1R)	36,4	48,7 (1R)
5*	Ácido (R)- α -metoxifenilacético	47,2	48,0 (1R)	45,2	52,5 (1R)
6*	Ácido O-acetil-L-mandélico	46,7	44,9 (1S)	41,5	56,1 (1S)
7*	Ácido Di-benzoil-L-tartárico	11,8	41,9 (1R)	21,4	8,2 (1R)
8	Ácido O-acetil-D-mandélico	47,2	35,9 (1R)	42,2	53,8 (1R)
9*	N-Boc-L-alanina	40,0	18,2 (1R)	30,7	61,3 (1R)
* Indica que el ejemplo comparativo					

(Etapas de realización de resolución óptica a partir de la mezcla de diastereoisómeros)

(Ejemplo 1)

- 5 D-mandelato de [[(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo



Se añadió acetonitrilo (4,7 l, 8,6 v/p) a [6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (627,0 g, neto: 543,6 g, 2,05 mol, mezcla diastereomérica 85:15), y la mezcla se agitó a 40°C. A la solución de reacción, se añadió ácido D-mandélico (116,3 g, 0,76 mmol, 0,37 eq.), y la mezcla se agitó a 40°C durante 1 hora y, a continuación, se dejó enfriar lentamente a 3°C. Después de agitar a 3°C durante 1 hora, el cristal resultante se recogió por filtración. A continuación, el cristal se secó a presión reducida bajo la condición de 40°C para obtener D-mandelato de [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo como un polvo blanco (251,2 g, rendimiento: 29,4%, 97,6% ee, 99,6% de).

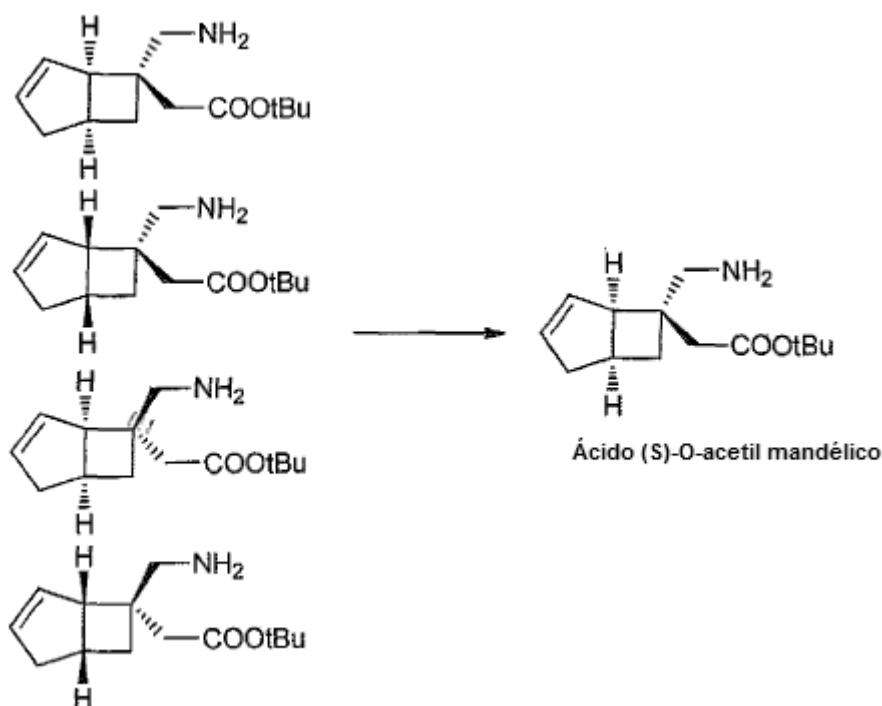
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1,04 (3H, t, J=7,6 Hz), 1,28-1,35 (1H, m), 1,39 (9H, s), 1,96-2,11 (4H, m), 2,28 (1H, d, J=15,6 Hz), 2,33 (1H, d, J=15,6 Hz), 2,36-2,40 (1H, m), 2,72 (1H, quint, J=7,6 Hz), 3,00 (1H, d, J=13,2 Hz), 3,03 (1H, d, J=13,2 Hz), 3,31 (1H, br s), 4,54 (1H, s), 5,21-5,23 (1H, m), 7,13-7,25 (3H, m), 7,35-7,37 (2H, m).

[α]₂₀^D -104,4° (C=0,108, MeOH).

Calculado anal. para C₂₄H₃₅NO₅: C, 69,04; H, 8,45; N, 3,35; Obtenido: C, 69,15; H, 8,46; N, 3,46.

(Ejemplo 2)

(S)-O-acetil-mandelato de [(1R,5S,6S)-6-(aminometil)bicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo



Se añadió acetonitrilo (10 ml, 5,0 v/p) a [6-(aminometil)bicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (1,9 g, 8,0 mmol, mezcla diastereomérica 90:10). A la mezcla se añadió ácido (S)-O-acetil-mandélico (0,45 eq.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 2,5 horas, el cristal depositado se filtró y se lavó con acetonitrilo. El cristal obtenido se secó a presión reducida para obtener (S)-O-acetil-mandelato de [(1R, 5S, 6S)-6-aminometil-3-etilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo como un cristal blanco (0,904 g, rendimiento: 26,2%, 90,4% ee, 99% de). Este cristal blanco (620 mg) se suspendió en acetonitrilo (6,2 ml, 10,0 v/p), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El cristal resultante se filtró, y el cristal obtenido se secó a presión reducida para obtener (S)-O-acetil-mandelato como un polvo blanco (557,6 mg, pureza óptica: 95,7% ee).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 1,44-1,51 (1H, m), 1,45 (9H, s), 2,08-2,22 (2H, m), 2,13 (3H, s), 2,42 (2H, s), 2,50-2,57 (1H, m), 2,86 (1H, quint, J=7,6 Hz), 3,06-3,16 (1H, m), 3,25-3,33 (2H, m), 5,65-5,70 (1H, m), 5,74 (1H, s), 5,95-5,99 (1H, m), 7,25-7,34 (3H, m), 7,47-7,51 (2H, m).

[α]₂₀^D -18,9° (C 0,095, MeOH).

IR (KBr): cm⁻¹: 3046, 2977, 1726, 1584, 1235, 1144, 1028, 752.

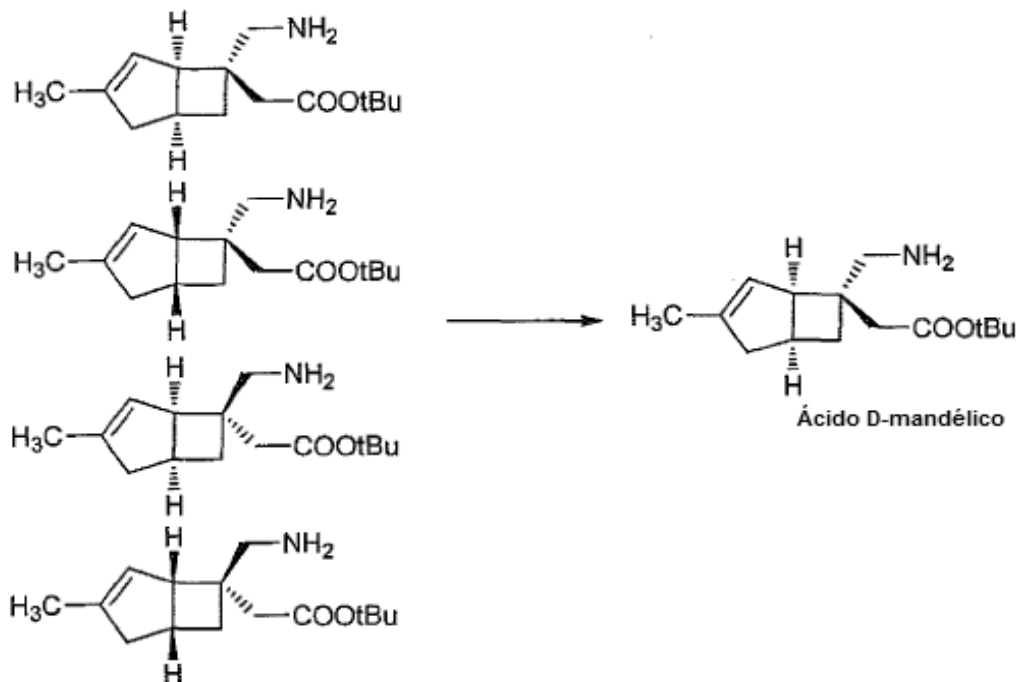
MS (FAB⁺): m/z: 238 (libre+H)⁺, MS (FAB+NaI): m/z: 260 (libre+Na⁺), (Ácido O-acetil-mandélico+Na)⁺.

Calculado anal. para C₂₄H₃₃NO₆: C, 66,80; H, 7,71; N, 3,25; Obtenido: C, 66,60; H, 7,72; N, 3,36.

(Ejemplo 3)

D-mandelato de [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-metilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo

Se añadió un disolvente (2,5 ml, 10 v/p) a [6-aminometil-3-metilbicyclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (237 mg, 1 mmol, mezcla diastereomérica 90:10). A la mezcla se añadió ácido D-mandélico (0,5 eq.), y la mezcla se agitó durante 2 horas bajo enfriamiento con hielo. El cristal depositado se filtró. El cristal obtenido se secó a presión reducida para obtener D-mandelato al rendimiento y a la pureza óptica mostrados en la Tabla 2 a continuación. La pureza óptica se analizó mediante la conversión de la sal obtenida en la forma libre con una solución acuosa de bicarbonato sódico y, a continuación, la derivatización de la forma libre en una forma de 3,5-dinitrobenzoilo.



(Tabla 2)

	Disolvente	Rendimiento	ee% ^(a)
1	Acetonitrilo	8,5%	48,5%ee
2	Acetato de etilo	4,6%	79,9%ee
3	Tolueno	11,2%	85,0%ee
4	Cliclopentil metil éter	13,8	82,4%ee

a) cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo, HPLC

Condiciones del análisis mediante HPLC (medición de pureza óptica, analizada después de la derivación a la forma 3,5-dinitrobenzoilo)

Columna: CHIRALPAK AS-RHx2 (Daisel, 4,6 mm x 150 mm, 5 µm) Detección: 220 nm, Temperatura de columna: 40°C, Caudal: 0,8 ml/min

Fase móvil: MeCN / tampón de fosfato 5 mM (pH 7,0) = 55 / 45

Tiempo de retención: 28,0 min, 23,6 min, 26,0 min ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ ppm: 1,45-1,51 (1H, m), 1,45 (9H, s), 1,82 (3H, s), 2,02-2,14 (2H, m), 2,41 (2H, s), 2,42-2,55 (1H, m), 2,85 (1H, quint, J=7,2 Hz), 3,06 -3,13 (1H, m), 3,23 (1H, d, J=13,2 Hz), 3,26 (1H, d, J=13,2 Hz), 4,84 (1H, s), 5,25 -5,28 (1H, m), 7,19 -7,30 (3H, m), 7,44 -7,47 (2H, m).

[α]₂₀^D -97,4° (C 0,102, MeOH).

IR (KBr): cm⁻¹: 3424, 2974, 2929, 1722, 1571, 1366, 1152, 1060, 755, 701.

MS (FAB⁺): m/z: 252 (libre+H)⁺, MS (FAB+NaI): m/z: 274 (libre+Na)⁺, 175 (ácido mandélico+Na)⁺.

(Etapas de desprotección del grupo éster y formación de la sal)

(Ejemplo 4)

P-toluenosulfonato de ácido [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

5 D-mandelato de [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo

Se suspendió (4,17 g, 10 mmol) en tolueno (21 ml). A la suspensión se añadieron trietilamina (2,09 ml) y, a continuación, agua (21 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 20 minutos, la capa orgánica se separó y se extrajo. La capa orgánica se lavó de nuevo con agua (10 ml) y, a continuación, se concentró a presión reducida para obtener la forma libre de [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo como una sustancia aceitosa. Se añadió tolueno (16 ml) y, a continuación, monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (2,28 g), y la mezcla se agitó a 70°C. Durante la agitación, se añadió además tolueno (15 ml) y después de 3 horas, la mezcla se dejó enfriar. El sólido depositado se filtró, a continuación se lavó con tolueno y, a continuación, se secó a presión reducida para obtener p-toluenosulfonato de ácido [(1R,5S,6S)-6-aminometil-3-etilbiciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético como un polvo blanco (3,90 g).

15 ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 1,10 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,49 (1H, dd, J=7,4, 12,4 Hz), 2,06-2,20 (4H, m), 2,37 (3H, s), 2,49 -2,55 (1H, m), 2,51 (2H, s), 2,87 (1H, quint, J=7,4 Hz), 3,12 (1H, br s), 3,29 (1H, d, J=13,3 Hz), 3,33 (1H, d, J=13,3 Hz), 5,31 -5,32 (1H, m), 7,22 - 7,25 (2H, m), 7,69 -7,72 (2H, m).

[α]₂₀^D -56,1° (C 0,108, MeOH).

TR (KBr): cm⁻¹: 3149, 2962, 1708, 1498, 1237, 1164, 1038, 1011, 813, 680, 566.

20 MS (FAB⁺): m/z: 210 (libre+H)⁺, 412 (2Mlibre+H)⁺.

(Ejemplo 5)

Bencenosulfonato de ácido [(1R,5S,6S)-6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético

Se suspendió (S)-O-acetil-mandelato de acetato de [(1R,5S,6S)-6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo (116 mg, 0,269 mmol) en anisol (0,58 ml). A la suspensión se añadieron agua (0,6 ml) y, a continuación, trietilamina (0,045 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, la capa orgánica se separó y se extrajo. La capa orgánica se lavó de nuevo con agua (300 ml) y, a continuación, se concentró a presión reducida para obtener una solución de la forma libre de E[(1R,5S,6S)-6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acetato de tert-butilo en anisol. Se añadió ácido bencenosulfónico (46 mg) a la misma, y la mezcla se agitó a 70°C durante 1,25 horas y se dejó enfriar. El sólido depositado se filtró, y el polvo filtrado se lavó de nuevo vertiendo acetona, y se secó bajo presión reducida para obtener bencenosulfonato de ácido [(1R,5S,6S)-6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-il]acético como un polvo blanco (55,5 mg).

35 ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 1,51 (1H, dd, J=7,6, 12,4 Hz), 2,12-2,20 (2H, m), 2,51 (2H, s), 2,51-2,57 (1H, m), 2,88 (1H, quint, J=7,4 Hz), 3,17-3,18 (1H, m), 3,32 (1H, d, J=13,3 Hz), 3,36 (1H, d, J=13,3 Hz), 5,69-5,71 (1H, m), 5,97-5,99 (1H, m), 7,39 -7,44 (3H, m), 7,81-7,84 (2H, m).

[α]₂₀^D -99,7° (C 0,09, MeOH).

TR (KBr): cm⁻¹: 3125, 3054, 2988, 1705, 1515, 1412, 1237, 1163, 1121, 1016, 730, 689, 621, 563.

MS (FAB⁺): m/z: 182 (libre+H)⁺, m/z: 363 (2Mlibre+H)⁺. Calculado anal. para C₁₆H₂₁NO₅S: C, 56,62; H, 6,24; N, 4,13; Obtenido: C, 56,19; H, 6,21; N, 4,13.

Texto libre para listado de secuencias

40 SEC ID N°: 1: cebador directo de PCR para el primer semi-fragmento de Cacna2d1 humano.

SEC ID N°: 2: cebador inverso de PCR para el primer semi-fragmento de Cacna2d1 humano.

SEC ID N°: 3: cebador directo de PCR para el segundo semi-fragmento de Cacna2d1 humano.

SEC ID N°: 4: cebador inverso de PCR para el segundo semi-fragmento de Cacna2d1 humano.

SEC ID N°: 5: sitio de multiclonación de un vector pBluescript 2.

45 <110> Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> procedimiento sintético para derivado biciclo-gamma-aminoácido

<130> DSFP1024

<160> 7

Versión <170> PatentIn 3.4

5

<210> 1

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador directo de PCR para extremo frontal de Cacna2d1 humano

<400> 1

15 agctgcggcc gctagcgcca ccatggctgg ctgcctgctg gc 42

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso de PCR para extremo frontal de Cacna2d1 humano

<400> 2

25 attaggatcg attgcaaagt aataccc 27

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador directo de PCR para extremo posterior de Cacna2d1 humano

35 <400> 3

aatgggtatt actttgcaat cgatcc 26

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> cebador inverso de PCR para extremo posterior de Cacna2d1 humano

<400> 4

10 agtcggatcc tcataacagc cggtgtgtgc tg 32

<210> 5

<211> 98

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> sitio de clonación múltiple del vector pBluescript 2

20 <400> 5

ccaccgcggt ggcggccgct ctagaactag tggatcccc gggctgcagg aattcgatat 60

caagcttata gataccgtcg acctcgaggg ggggcccg 98

<210> 6

25 <211> 1573

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

30

ES 2 635 354 T3

ggcggccgct agcgccacca tggctgctgg ctgcctgctg gccttgactc tgacactttt	60
ccaatctttg ctcatcggcc cctcgtcgga ggagccgttc ccttcggccg tcaactatcaa	120
atcatgggtg gataagatgc aagaagacct tgtcacactg gcaaaaacag caagtggagt	180
caatcagctt gttgatattt atgagaaata tcaagatttg tatactgttg aaccaaataa	240
tgcacgccag ctggtagaaa ttgcagccag ggatattgag aaacttctga gcaacagatc	300
taaagccctg gtgcgcctgg cattggaagc ggagaaagt caagcagctc accagtggag	360
agaagatttt gcaagcaatg aagttgtcta ctacaatgca aaggatgatc tcgatcctga	420
gaaaaatgac agtgagccag gcagccagag gataaaacct gttttcattg aagatgctaa	480
ttttggacga caaatatctt atcagcacgc agcagtccat attcctactg acatctatga	540
gggctcaaca attgtgttaa atgaactcaa ctggacaagt gccttagatg aagttttcaa	600
aaagaatcgc gaggaagacc cttcattatt gtggcagggt tttggcagt ccaactggcct	660
agctcgatat tatccagctt caccatgggt tgataatagt agaactccaa ataagattga	720
cctttatgat gtacgcagaa gaccatggta catccaagga gctgcactc ctaaagacat	780
gcttattctg gtggatgtga gtggaagtgt tagtggattg acacttaaac tgatccgaac	840
atctgtctcc gaaatgttag aaaccctctc agatgatgat ttcgtgaatg tagcttcatt	900
taacagcaat gctcaggatg taagctgttt tcagcacctt gtccaagcaa atgtaagaaa	960
taaaaaagtg ttgaaagacg cgggtgaataa tatcacagcc aaaggaatta cagattataa	1020
gaagggcttt agttttgctt ttgaacagct gcttaattat aatgtttcca gagcaaactg	1080
caataagatt attatgctat tcacggatgg aggagaagag agagcccagg agatatttaa	1140
caaatacaat aaagataaaa aagtacgtgt attcacgttt tcagttggtc aacacaatta	1200
tgacagagga cctattcagt ggatggcctg tgaaaacaaa ggttattatt atgaaattcc	1260
ttccattggg gcaataagaa tcaataactca ggaatatttg gatgttttg gaagaccaat	1320
ggtttttagca ggagacaaag ctaagcaagt ccaatggaca aatgtgtacc tggatgcatt	1380
ggaactggga cttgtcatta ctggaactct tcoggtcttc aacataaccg gccaatttga	1440
aaataagaca aacttaaaga accagctgat tcttggtgtg atgggagtag atgtgtcttt	1500

ES 2 635 354 T3

ggaagatatt aaaagactga caccacgttt tacactgtgc cccaatgggt attactttgc 1560

aatcgatcct aat 1573

<210> 7

5 <211> 3301

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

10

ES 2 635 354 T3

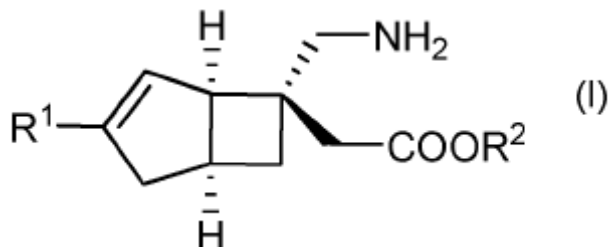
ggcggccgct agcgccacca tggctgctgg ctgcctgctg gccttgactc tgacactttt	60
ccaatctttg ctcatcggcc cctcgtcgga ggagccgttc ccttcggccg tcaactatcaa	120
atcatgggtg gataagatgc aagaagacct tgtcacactg gcaaaaaacag caagtggagt	180
caatcagctt gttgatattt atgagaaata tcaagatttg tatactgtgg aaccaaataa	240
tgcacgccag ctggtagaaa ttgcagccag ggatattgag aaacttctga gcaacagatc	300
taaagccctg gtgcgcctgg cattggaagc ggagaaagtt caagcagctc accagtggag	360
agaagatttt gcaagcaatg aagttgtcta ctacaatgca aaggatgac tcgatcctga	420
gaaaaatgac agtgagccag gcagccagag gataaaacct gttttcattg aagatgctaa	480
ttttggacga caaatatctt atcagcacgc agcagtcctt attcctactg acatctatga	540
gggctcaaca attgtgttaa atgaactcaa ctggacaagt gccttagatg aagttttcaa	600
aaagaatcgc gaggaagacc cttcattatt gtggcagggt tttggcagtg ccaactggcct	660
agctcgatat tatccagctt caccatgggt tgataatagt agaactccaa ataagattga	720
cctttatgat gtacgcagaa gaccatggta catccaagga gctgcatctc ctaaagacat	780
gcttattctg gtggatgtga gtggaagtgt tagtggattg acacttaaac tgatccgaac	840
atctgtctcc gaaatgttag aaaccctctc agatgatgat ttctgtgaatg tagcttcatt	900
taacagcaat gctcaggatg taagctgttt tcagcacctt gtccaagcaa atgtaagaaa	960
taaaaaagtg ttgaaagacg cgggtgaataa tatcacagcc aaaggaatta cagattataa	1020
gaagggtttt agttttgctt ttgaacagct gcttaattat aatgtttcca gagcaaactg	1080
caataagatt attatgctat tcacggatgg aggagaagag agagcccagg agatatttaa	1140
caaatacaat aaagataaaa aagtacgtgt attcacgttt tcagttggtc aacacaatta	1200
tgacagagga cctattcagt ggatggcctg tgaaaacaaa ggttattatt atgaaattcc	1260
ttccattggg gcaataagaa tcaataactca ggaatatttg gatgttttgg gaagaccaat	1320
ggtttttagca ggagacaaag ctaagcaagt ccaatggaca aatgtgtacc tggatgcatt	1380
ggaactggga cttgtcatta ctggaactct tccggctctc aacataaccg gccaatttga	1440
aaataagaca aacttaaaga accagctgat tcttggtgtg atgggagtag atgtgtcttt	1500
ggaagatatt aaaagactga caccacgttt tacactgtgc cccaatgggt attactttgc	1560
aatcgatcct aatggttatg ttttattaca tccaaatctt cagccaaaga accccaaatc	1620

ES 2 635 354 T3

tcaggagcca gtaacattgg atttccttga tgcagagtta gagaatgata ttaaagtgga 1680
gattcgaaat aagatgattg atggggaaaag tggagaaaaa acattcagaa ctctgggttaa 1740
atctcaagat gagagatata ttgacaaagg aaacaggaca tacacatgga cacctgtcaa 1800
tggcacagat tacagtttgg ccttgggtatt accaacctac agtttttact atataaaagc 1860
caaactagaa gagacaataa ctcaggccag atcaaaaaag ggcaaaatga aggattcgga 1920
aaccctgaag ccagataatt ttgaagaatc tggctataca ttcatagcac caagagatta 1980
ctgcaatgac ctgaaaatat cggataataa cactgaattt ctttttaaatt tcaacgagtt 2040
tattgataga aaaactccaa acaaccctac atgtaacgcg gatttgatta atagagtctt 2100
gcttgatgca ggcttttaca atgaacttgt ccaaaattac tggagtaagc agaaaaatat 2160
caagggagtg aaagcacgat ttgttgtgac tgatggtggg attaccagag tttatcccaa 2220
agaggctgga gaaaattggc aagaaaacc agagacatat gaggacagct tctataaaag 2280
gagcctagat aatgataact atgttttcac tgctccctac tttacaaaa gtggacctgg 2340
tgccatgaa tcgggcatta tggttaagcaa agctgtagaa atatatattc aagggaaact 2400
tcttaaact gcagttgttg gaattaaaat tgatgtaa at tctggatag agaatttcac 2460
caaaacctca atcagagatc cgtgtgctgg tccagtttgt gactgcaaaa gaaacagtga 2520
cgtaatggat tgtgtgatc ttgatgatgg tgggtttctt ctgatggcaa atcatgatga 2580
ttataactaat cagattggaa gatttttttg agagattgat ccagcttga tgagacacct 2640
ggttaatata tcagtttatg cttttaacaa atcttatgat tatcagtcag tatgtgagcc 2700
cgggtctgca ccaaaacaag gagcaggaca tcgctcagca tatgtgccat cagtagcaga 2760
catattacaa attggctggg gggccactgc tgctgctgg tctattctac agcagtttct 2820
cttgagtttg acctttccac gactccttga ggcagttgag atggaggatg atgacttcac 2880
ggctccctg tccaagcaga gctgcattac tgaacaaacc cagtatttct tcgataacga 2940
cagtaaatca ttcagtgggtg tattagactg tggaaactgt tccagaatct ttcattggaga 3000
aaagcttatg aacaccaact taatattcat aatggttgag agcaaaggga catgtccatg 3060
tgacacacga ctgctcatac aagcggagca gacttctgac ggtccaaatc cttgtgacat 3120
ggttaagcaa ccagatacc gaaaagggc tgatgtctgc tttgataaca atgtcttga 3180
ggattatact gactgtggtg gtgtttctgg attaaatccc tccctgtggg atatcattgg 3240
aatccagttt ctactacttt ggctgggtatc tggcagcaca caccggctgt tatgaggatc 3300
c 3301

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo mediante resolución óptica:



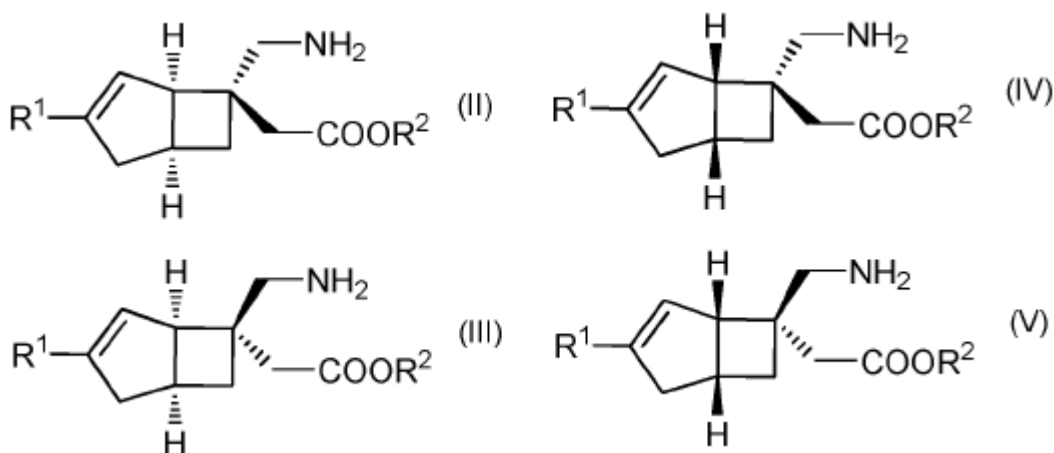
10 en la que cada sustituyente se define como sigue:

R^1 : un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6, y

R^2 : un átomo de hidrógeno o un grupo protector para el grupo carboxi,

en el que el procedimiento comprende

15 disolver una mezcla de compuestos representados por las fórmulas generales (II), (III), (IV) y (V) y un ácido orgánico ópticamente activo en un disolvente:



en el que las fórmulas generales (I) y (II) son las mismas,

en el que el ácido orgánico ópticamente activo es ácido D-mandélico o ácido O-acetil-D-mandélico,

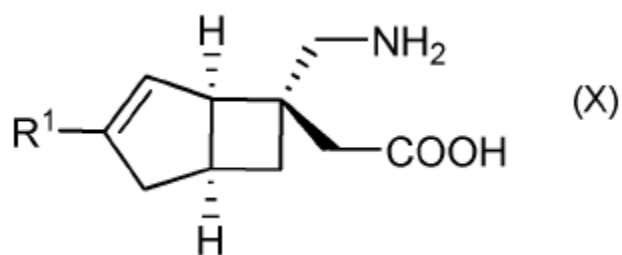
en el que el disolvente es acetonitrilo, acetato de etilo, tolueno, o ciclopentil metil éter,

y, a continuación, depositar un cristal.

30 2. Procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo según la reivindicación 1, en el que R^1 es un átomo de hidrógeno, un grupo metilo o un grupo etilo.

3. Procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (I) o una sal del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que R^2 es un grupo t-butilo.

4. Procedimiento de producción de un compuesto representado por la fórmula general (X) o una sal del mismo:



5

en la que cada sustituyente se define como sigue:

R^1 : un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6,

en el que el procedimiento comprende

10

producir un compuesto representado por la fórmula general (I) mediante un procedimiento de producción según la reivindicación 1 y, a continuación, realizar la etapa de desprotección de un grupo protector R^2 para el grupo carboxi en el compuesto representado por la fórmula general (I) o realizar esta etapa de desprotección y además la etapa de formar un ácido o una sal.