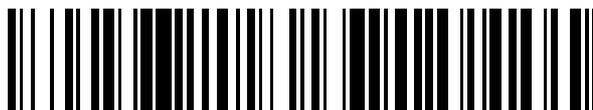


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 711**

51 Int. Cl.:

C07D 319/06 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2014 PCT/CN2014/083636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15168998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2014 E 14891345 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 3141544**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un producto intermedio quirál para su uso en estatinas**

30 Prioridad:

09.05.2014 CN 201410195360

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

07.05.2018

73 Titular/es:

ASYMCHM LABORATORIES (TIANJIN) CO., LTD (20.0%)

No. 6 Dongting 3rd Street, TEDA

Tianjin 300457, CN;

ASYMCHM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD (20.0%);

TIANJIN ASYMCHM PHARMACEUTICAL CO.

LTD. (20.0%);

ASYMCHM LABORATORIES (FUXIN) CO., LTD

(20.0%) y

JILIN ASYMCHM LABORATORIES CO., LTD

(20.0%)

72 Inventor/es:

HONG, HAO;

CHEN, CHAOYONG;

LI, JIUYUAN;

SHEN, LITAO;

GUO, LINA y

TIAN, HONGYING

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 666 711 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

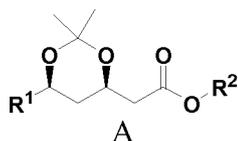
Procedimiento de preparación de un producto intermedio quiral para su uso en estatinas

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere al campo de síntesis de productos intermedios farmacéuticos, y específicamente a un procedimiento para preparar un producto intermedio quiral para su uso en fármacos de estatinas.

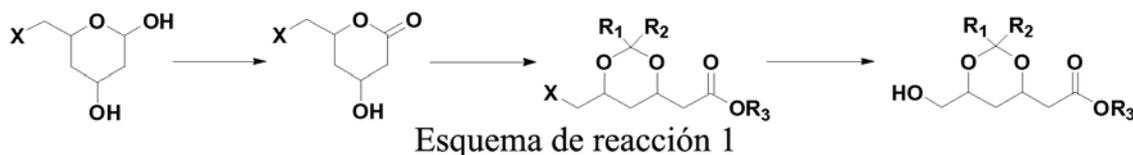
10 Estado de la técnica

- Los fármacos de estatinas son inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Esta clase de fármacos bloquean la vía metabólica del ácido mevalónico intracelular y reduce la síntesis intracelular de colesterol inhibiendo competitivamente la enzima limitadora de la velocidad para la síntesis de colesterol endógeno, la HMG-CoA reductasa, de manera que aumentan el número y la actividad del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la superficie de la membrana celular estimulada por retroalimentación (principalmente de células hepáticas), aumentan la tasa de aclaramiento de colesterol en suero y reducen el nivel de los mismos. Los fármacos de estatinas también pueden inhibir la síntesis por el hígado de apolipoproteína B-100, de manera que reducen la síntesis y secreción de AV enriquecida con triglicéridos y lipoproteínas. Además, la aplicación en fase temprana de fármacos de estatinas en pacientes que sufren síndrome coronario agudo puede inhibir la respuesta inflamatoria del endotelio vascular, estabilizar la placa aterosclerótica, mejorar las funciones del endotelio vascular; retrasar el grado de aterosclerosis (AS) y tener efectos antiinflamatorios, neuroprotectores y antitrombóticos. En consecuencia, tienen unas perspectivas muy amplias de aplicación.
- 25 Las síntesis de los fármacos de estatinas comercializados en la actualidad, como atorvastatina, pitavastatina, simvastatina y rosuvastatina, requieren el uso de una cadena lateral de glicol quiral de fórmula A como material de partida.



30

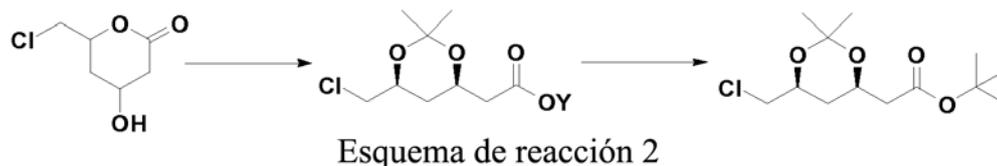
En la solicitud de patente WO-03.006.656-A, se usa 2,4-didesoxihexosa o 2,4,6-tridesoxihexosa como un producto intermedio importante, que experimenta oxidación, acetalación e hidrólisis para proporcionar el producto intermedio de cadena lateral alcohólica.



35

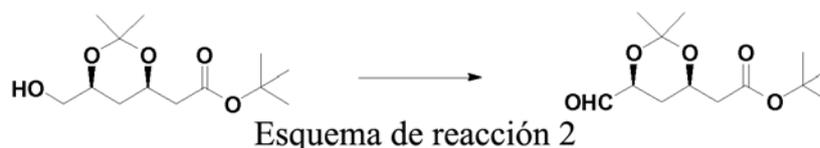
La solicitud de patente WO-0.206.266-A describe una vía para sintetizar una serie de compuestos de (4R-cis)-6-cloro-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-acetato de terc-butilo a partir de 6-clorometil-4-hidroxitetrahydro-2H-piran-2-ona, donde Y representa Na, Ca o un tetraalquilamonio.

40



Las solicitudes de patente US-2006/004.200-A y WO-2008/059.519-A describen un procedimiento de síntesis en el que se oxida (4*R*-Cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-acetato de terc-butilo en un producto intermedio de cadena lateral de aldehído.

5



Esquema de reacción 2

En las vías anteriores existen algunos problemas en los aspectos de síntesis de los materiales de partida, selección de la vía y separación y purificación de los productos intermedios, que conducen a un alto coste de la síntesis y rendimientos globales bajos. Por tanto, el desarrollo de un procedimiento de síntesis con bajo coste, respetuoso con el medio ambiente y con alta calidad del producto tendría un valor económico y social muy elevado.

El documento JP-H06-107.592-A describe un procedimiento para la producción de un derivado ópticamente activo del ácido 6-oxo-3,5-dihidroxihexanoico por descomposición oxidativa de un derivado ópticamente activo de éster-1,2-diol de β,δ-dihidroxiácido.

Minami y col. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 513-516 describen la síntesis de 6-oxo-3,5-sin-isopropilidendioxihexanoato ópticamente activo por reducción estereoselectiva de ésteres β,δ-diceto derivados de D-tartrato.

Wu y col. Tetrahedron Asymmetry 2009, 20, 2504-2509 describen una síntesis enantioselectiva de (S)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo a partir de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo por dicetorreductasa recombinante.

Guo y col. Tetrahedron Asymmetry 2006, 17, 1589-1602 describen la síntesis de (3*R*,5*S*)-dihidroxi-6-benciloxihexanoatos de etilo y t-butilo por reducción microbiana diaestereoselectiva y enantioselectiva.

25

Resumen

Para superar los problemas de altos costes y bajos rendimientos en las vías de síntesis existentes, se desarrolla una vía de síntesis totalmente nueva. Un objetivo de la presente descripción es proporcionar un procedimiento para preparar un producto intermedio quiral de fórmula (I) para su uso en fármacos de estatinas.

30

El procedimiento de preparación proporcionado en la presente descripción comprende las etapas siguientes:

1) realización de una reacción de eterificación usando ácido cloroacético y alcohol bencílico como materiales de partida para producir ácido benciloxiacético;

35

2) realización de una reacción de condensación de ácido benciloxiacético con morfolina para producir 2-benciloximorfolina acetamida;

3) realización de una reacción de sustitución de 2-benciloximorfolina acetamida con un éster de acetilacetato de fórmula (5) para producir un producto intermedio de dicetona de fórmula (6);

40

4) realización de una reducción asimétrica del producto intermedio de dicetona de fórmula (6) para producir un producto intermedio de diol quiral de fórmula (7);

45

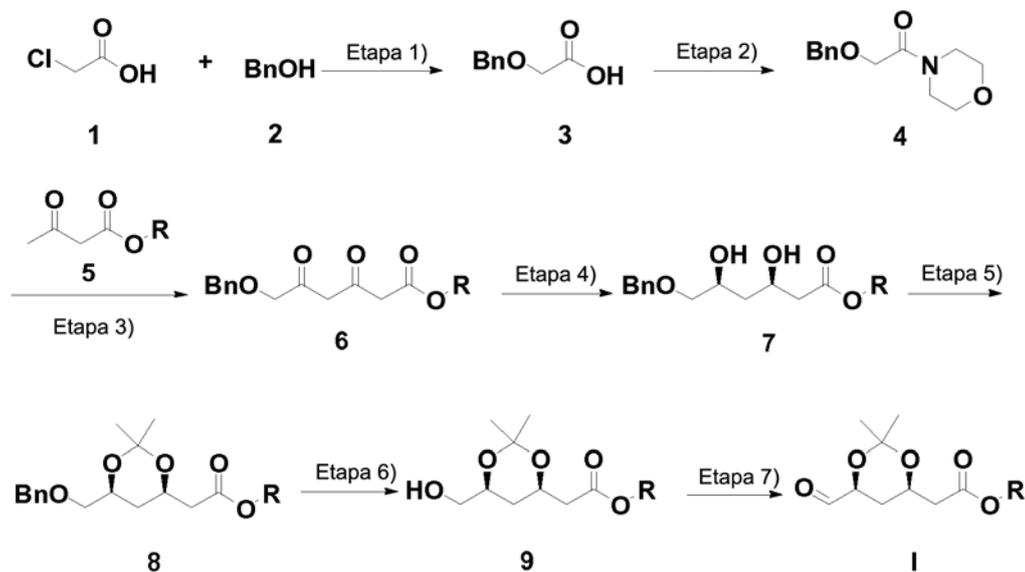
5) reacción del producto intermedio de diol quiral de fórmula (7) con 2,2-dimetoxipropano para producir éster de (4*R*-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (8);

6) eliminación del grupo bencilo a partir del éster de (4*R*-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (8) para proporcionar éster de (4*R*-cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (9); y

50

7) realización de una reacción de oxidación del éster de (4*R*-cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (9) para proporcionar el producto intermedio quiral de fórmula (I).

El esquema de reacción es el siguiente:

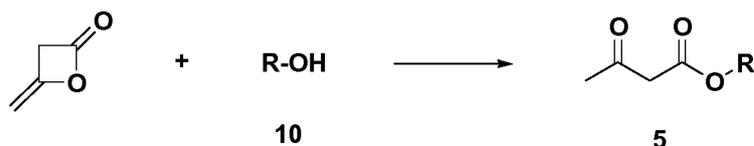


5 donde R representa alquilo C4~C10.

Preferentemente, R representa terc-butilo, terc-pentilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

En una realización, el acetilacetato de fórmula (5) se prepara a través de reacción de adición por apertura de anillo entre diceteno y un alcohol de fórmula (10).

El esquema de reacción es el siguiente:



15

En una realización, la reducción asimétrica en la etapa 4) comprende: la dispersión uniforme del producto intermedio de dicetona de fórmula (6) en un disolvente, la adición de una reductasa, ácido fórmico o una sal de formiato, y NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida adenina), el ajuste del valor de pH a 6,2~6,4, a continuación el calentamiento del sistema hasta 27~33°C y el mantenimiento de la temperatura durante 17~24 h.

20

En la etapa 4), la relación en masa entre la reductasa y el producto intermedio de dicetona de fórmula (6) es 0,00005~0,004:1.

En una realización, la reductasa es un mutante de dicetorreductasa que comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación:

- a) SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6;
- b) una secuencia que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia mostrada en a) y que tiene actividades de dicetorreductasa mejoradas; o
- c) una secuencia obtenida por delección, adición y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en una

secuencia mostrada en a) y que tiene actividades de dicetorreductasa mejoradas,

donde la secuencia mostrada en b) no es una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7.

- 5 Preferentemente, el mutante de dicetorreductasa comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En la etapa 4), el disolvente es uno o más seleccionados de entre el grupo que consiste en agua purificada, polietilenglicol, isopropanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etanol, n-heptano, tolueno, acetona, DMF y metanol.

10

En la etapa 4), la sal de formiato se selecciona de entre el grupo que consiste en formiato de amonio, formiato de sodio y formiato de potasio, y la razón molar entre ácido fórmico o sal de formiato y el producto intermedio de dicetona de fórmula (6) es 2~10:1.

- 15 En la etapa 4), la relación en masa entre NAD^+ y el producto intermedio de dicetona de fórmula (6) es 0,001~0,1:1.

El procedimiento de preparación proporcionado en la presente descripción tiene las siguientes ventajas.

- 20 (1) En comparación con las vías de síntesis existentes, la presente vía de síntesis es más nueva, lo que amplía el campo del desarrollo de fármacos de estatinas.

- 25 (2) Los centros quirales de diol pueden introducirse de forma conveniente en el compuesto de producto intermedio 6 por reducción enzimática, especialmente por el mutante de dicetorreductasa proporcionado en la presente descripción, que no sólo es económico, sino también de calidad fiable, y el diol puede obtenerse con un alto rendimiento, buena pureza y alta selectividad óptica.

- 30 (3) La presente vía de síntesis usa ácido cloroacético y alcohol bencílico como materiales de partida. Los materiales de partida usados en las etapas de producto intermedio son económicos. El procedimiento es fácil de realizar. El producto final tiene buena pureza. El rendimiento es alto: el rendimiento global puede llegar al 90,0% o más. En consecuencia, el coste de fabricación puede reducirse de manera efectiva.

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.

Realizaciones específicas de la presente descripción

35

Para hacer más claros los objetivos, las soluciones técnicas y las ventajas de la presente solicitud, a continuación se describen las soluciones técnicas de realizaciones de ejemplo de la presente solicitud.

- 40 La presente descripción proporciona un procedimiento para preparar un producto intermedio quiral de fórmula (I) para su uso en fármacos de estatinas, que comprende las etapas siguientes:

1) realización de una reacción de eterificación usando ácido cloroacético (1) y alcohol bencílico (2) como materiales de partida para producir ácido benciloxiacético (3);

- 45 2) realización de una reacción de condensación de ácido benciloxiacético (3) con morfina para producir 2-benciloximorfina acetamida (4);

3) realización de una reacción de sustitución de 2-benciloximorfina acetamida (4) con un éster de acetilacetato de fórmula (5) para producir un producto intermedio de dicetona de fórmula (6);

50

4) realización de una reducción asimétrica del producto intermedio de dicetona de fórmula (6) para producir un producto intermedio de diol quiral de fórmula (7);

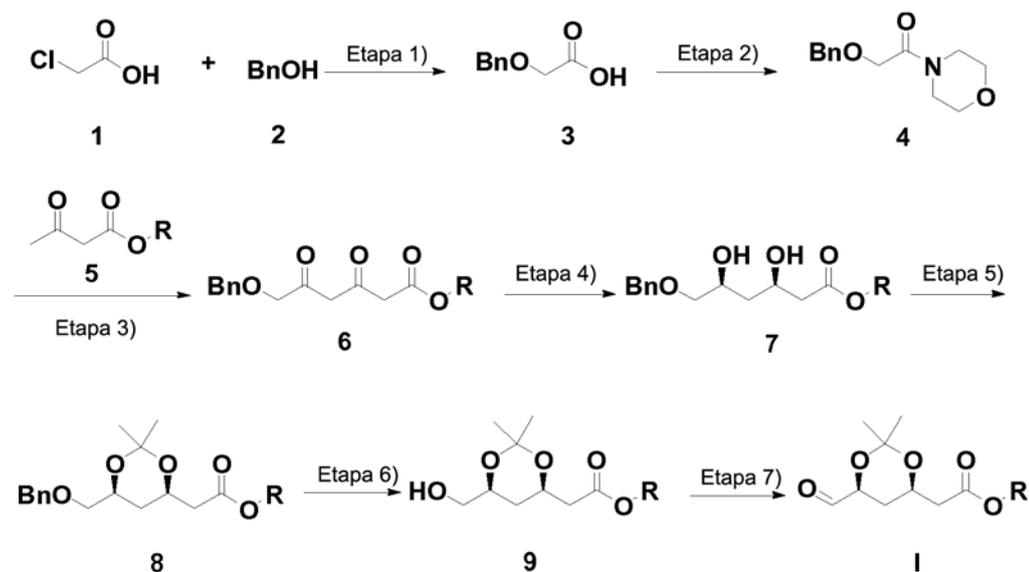
- 55 5) reacción del producto intermedio de diol quiral de fórmula (7) con 2,2-dimetoxipropano para producir un éster de (4*R*-*cis*)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (8);

6) eliminación del grupo bencilo del éster de (4*R*-*cis*)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (8) para proporcionar éster de (4*R*-*cis*)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (9); y

- 60 7) realización de una reacción de oxidación del éster de (4*R*-*cis*)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato

de fórmula (9) para proporcionar el producto intermedio quiral de fórmula (I).

El esquema de reacción es el siguiente:



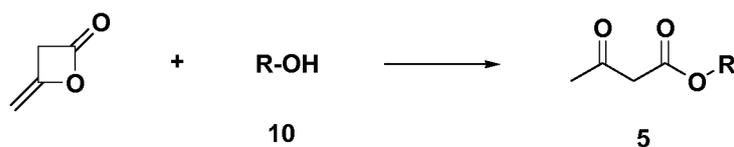
5

donde R representa alquilo C4~C10.

En una realización del procedimiento de preparación de la presente descripción, R representa preferentemente terc-butilo, terc-pentilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

En una realización del procedimiento de preparación de la presente descripción, el acetilacetato de fórmula (5) se prepara a través de reacción de adición por apertura de anillo entre diceteno y el alcohol de fórmula (10).

15 El esquema de reacción es el siguiente:



20 Específicamente, el procedimiento específico de la etapa 1) puede comprender lo siguiente. Se añaden un disolvente orgánico y tolueno en un matraz de reacción, seguido por la adición de un álcali en porciones mientras se controla la temperatura del sistema, y se completa la adición de alcohol bencílico en porciones después de la adición del álcali. Se disuelve ácido cloroacético en un disolvente orgánico, y la solución resultante se añade gota a gota en el sistema de reacción descrito anteriormente mientras se controla la temperatura. La reacción se continúa hasta que el ácido cloroacético se consume por completo. Se enfría el sistema, seguido por la adición de agua y la eliminación del disolvente orgánico a presión reducida. Se extrae la fase acuosa con un disolvente orgánico. Se ajusta el pH de la fase acuosa para que sea ácido mientras se controla la temperatura del sistema. Se extrae la fase acuosa con un disolvente orgánico, se seca y se concentra para proporcionar el compuesto 3. La pureza del producto obtenido en la etapa 1) es del 97~99%, y el rendimiento es del 85~90%.

30 En la etapa 1) anterior: el disolvente orgánico usado para la reacción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, acetonitrilo y éter metil-terc-butílico, o una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente tetrahidrofurano; el álcali añadido puede seleccionarse de

- entre carbonato de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, terc-butóxido de potasio, etóxido de sodio, hidróxido de sodio, sodio metálico, hidruro de sodio y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente hidróxido de potasio; la razón molar entre el álcali añadido y el ácido cloroacético puede ser 1:1 ~ 100:1, preferentemente 3:1; la razón molar entre el alcohol bencílico añadido y el ácido cloroacético puede ser 1:1 ~ 100:1, preferentemente 3:1; la temperatura a la que se añaden el álcali y el alcohol bencílico puede ser 10~100°C, preferentemente 15~25°C; la temperatura a la que se añade el ácido cloroacético gota a gota puede ser 30~120°C, preferentemente 70~80°C; la velocidad a la que se añade la solución de ácido cloroacético gota a gota puede ser de 1 g/min a 100 g/min, preferentemente 10 g/min; la relación en masa entre agua y ácido cloroacético que se añaden después de enfriar puede ser 1:1 ~ 100:1, preferentemente 8:1; el valor de pH de la fase acuosa puede ser 1~6,
- 5 100:1, preferentemente 3:1; la temperatura a la que se añaden el álcali y el alcohol bencílico puede ser 10~100°C, preferentemente 15~25°C; la temperatura a la que se añade el ácido cloroacético gota a gota puede ser 30~120°C, preferentemente 70~80°C; la velocidad a la que se añade la solución de ácido cloroacético gota a gota puede ser de 1 g/min a 100 g/min, preferentemente 10 g/min; la relación en masa entre agua y ácido cloroacético que se añaden después de enfriar puede ser 1:1 ~ 100:1, preferentemente 8:1; el valor de pH de la fase acuosa puede ser 1~6,
- 10 preferentemente 2~3; el disolvente para extraer la fase acuosa ácida puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en 2-metilo, acetato de etilo, éter dietílico, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente éter metil-terc-butílico; y el volumen del disolvente usado para la extracción puede ser 3~30 veces, preferentemente 8 veces, con respecto al volumen de ácido cloroacético.
- 15 El procedimiento específico de la etapa 2) puede comprender lo siguiente. Se añaden un disolvente orgánico y ácido benciloxiacético (compuesto 3) en un matraz de reacción, seguido por la adición de gota a gota de un cloruro de acilo mientras se controla la temperatura del sistema. Después de completar la adición, se agita el sistema hasta que el compuesto 3 se consume completamente. A continuación se eliminan las sustancias de bajo punto de ebullición a presión reducida, y el líquido concentrado se almacena para su uso posterior. Se añaden un disolvente orgánico,
- 20 morfolina y un álcali en un matraz de reacción, seguido por la adición de gota a gota del líquido concentrado obtenido anteriormente mientras se controla la temperatura del sistema. Después de completar la adición, se agita el sistema mientras se mantiene la temperatura hasta que la morfolina se consume completamente. Se añade ácido clorhídrico diluido para inactivar la reacción. Se separa el líquido, y se lava la fase orgánica en secuencia con agua, bicarbonato de sodio saturado solución y agua, y se concentra para proporcionar benciloxietilmorfolinamida
- 25 (compuesto 4). La pureza del producto obtenido en la etapa 2) es del 97~99%, y el rendimiento es del 85~90%.

En la etapa 2) anterior: el disolvente orgánico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, tolueno, diclorometano, cloroformo, 2-metiltetrahidrofurano, acetonitrilo, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente diclorometano; el cloruro de acilo añadido puede

30 seleccionarse de entre el grupo que consiste en cloruro de oxalilo, cloruro de tionilo, cloruro de acetilo y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente cloruro de oxalilo; la temperatura a la que el cloruro de acilo se añade gota a gota puede ser -10~50°C, preferentemente 10~20°C; la razón molar entre el cloruro de acilo añadido y el compuesto 3 puede ser 1:1 ~ 10:1, preferentemente 1,5:1; la velocidad a la que la solución del cloruro de acilo se añade gota a gota puede ser de 1 g/min a 100 g/min, preferentemente 6 g/min; el álcali añadido puede

35 seleccionarse de entre el grupo que consiste en hidróxido de sodio, trietilamina, carbonato de sodio, carbonato de potasio, hidróxido de potasio, terc-butóxido de potasio, etóxido de sodio, diisopropiletilamina, piridina y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente trietilamina; la razón molar entre el álcali añadido y el compuesto 3 puede ser 1:1 ~ 10:1, preferentemente 1,5:1; y la temperatura a la que el líquido concentrado se añade gota a gota puede ser -10~50°C, preferentemente 10~20°C.

- 40 El procedimiento específico de la etapa 3) puede comprender lo siguiente. Se añaden un disolvente orgánico y un álcali en un matraz de reacción, seguido por la adición de compuesto 5 gota a gota mientras se controla la temperatura del sistema. Después de completar la adición, se enfría el sistema, seguido por la adición de gota a gota de una solución de una base orgánica mientras se controla la temperatura del sistema. Después de completar
- 45 la adición, se añade el compuesto 4 gota a gota y se agita el sistema hasta que el compuesto 4 se consume completamente. El sistema de reacción se inactiva con una solución acuosa ácida. Se separa el líquido, y se extrae la fase acuosa dos veces con un disolvente orgánico. Se combina la fase orgánica, se lava una vez con salmuera saturada y se concentra para proporcionar el compuesto 6 en bruto, al que se añade un disolvente orgánico para cristalización con el fin de proporcionar el compuesto 6 sólido. La pureza del producto obtenido en la etapa 3) es del
- 50 96,0~97,0%, y el rendimiento es del 65~70%.

En la etapa 3) anterior: el disolvente orgánico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, tolueno, 2-metiltetrahidrofurano, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente tetrahidrofurano; el álcali usado puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en

55 carbonato de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, terc-butóxido de potasio, etóxido de sodio, hidróxido de sodio, sodio metálico, hidruro de sodio y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente hidruro de sodio; la temperatura a la que el compuesto 5 se añade gota a gota puede ser -10~50°C, preferentemente 0~20°C; la velocidad a la que el compuesto 5 se añade gota a gota puede ser de 1 g/min a 100 g/min, preferentemente 10 g/min; la base orgánica usada puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en

60 diisopropiletilamida de litio, n-butil-litio, terc-butil-litio, etóxido de sodio, etóxido de sodio, terc-butóxido de sodio y una

mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente n-butil-litio; la solución acuosa ácida para inactivación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, bisulfato de sodio, cloruro de amonio, hidrogenofosfato de sodio y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente una solución de ácido clorhídrico diluido que tiene una concentración porcentual en masa del 3%; y el disolvente orgánico para extracción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en tolueno, 2-metiltetrahidrofurano, diclorometano, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente éter metil-terc-butílico.

El procedimiento específico de la etapa 4) puede comprender lo siguiente. Se dispersa uniformemente 6-(benciloxi)-3,5-dioxo-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 6) en un disolvente. Después de agitar hasta homogeneidad, se añaden una reductasa, ácido fórmico o una sal de formiato y NAD^+ . Se ajusta el pH a 6,2~6,4 con una solución acuosa de ácido fórmico o similar. Se calienta el sistema hasta 27~33°C, y se mantiene la temperatura durante 17~24 h. Después de que se ha completado la reacción, se calienta el sistema hasta 65~70°C para destruir la proteína de enzima. Se añade un disolvente orgánico, y se filtra el sistema con un filtro de tierra de diatomeas. Se separa el líquido, y se extrae de forma inversa la fase acuosa con un disolvente orgánico. Se combina la fase orgánica y se concentra. El producto resultante puede usarse directamente en la etapa siguiente. La pureza del producto obtenido en la etapa 4) es del 92~95%, el rendimiento es del 70~85%, el valor ee es superior al 99,5% y el valor de es del 90~99,5%.

En la etapa 4) anterior: el disolvente para dispersar el compuesto 6 puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en agua purificada, polietilenglicol, isopropanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etanol, n-heptano, tolueno, acetona, DMF y metanol, preferentemente agua purificada; el volumen del disolvente para dispersar puede ser 1~10 veces, preferentemente 4 veces, con respecto al volumen de compuesto 6; la cantidad de la reductasa puede ser 0,05-4 mg/g, preferentemente 0,1 mg/g, con respecto a la cantidad de compuesto 6; el volumen de reacción global puede ser 10~60 veces, preferentemente 30 veces, con respecto al volumen de compuesto 6; la razón molar entre ácido fórmico o una sal de formiato y el compuesto 6 puede ser de 2:1 a 10:1, preferentemente 2:1; la sal de formiato puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en formiato de amonio, formiato de sodio, formiato de potasio, preferentemente formiato de amonio; la relación en masa entre NAD^+ y el compuesto 6 puede ser de 0,001:1 a 0,1:1, preferentemente 0,03:1; el intervalo de pH puede ser 4,0~9,0, preferentemente 6,2+0,2; y el disolvente orgánico usado para extracción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en acetato de etilo, acetato de isopropilo, tetrahidrofurano, diclorometano, éter dietílico, éter metil-terc-butílico, n-heptano, tolueno, xileno y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente acetato de isopropilo.

El procedimiento específico de la etapa 5) puede comprender lo siguiente. Se añaden el (3R,5S)-6-benciloxi-3,5-dihidroxi-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 7), 2,2-dimetoxipropano y una cantidad catalítica de un ácido en secuencia a un disolvente orgánico. La reacción se continúa hasta que el compuesto 7 se consume sustancialmente. Se añade un ácido para lavado, seguido por la adición de un álcali para neutralizar el sistema. Las sustancias de bajo punto de ebullición se eliminan a presión reducida, seguido por la adición de agua, la separación del líquido y la extracción de la fase acuosa varias veces con un disolvente orgánico. Se combina la fase orgánica y se lava una vez con salmuera saturada. Se filtra la fase orgánica con un filtro de gel de sílice, y se concentra el filtrado. El producto resultante se usa directamente en la etapa siguiente. La pureza del producto obtenido en la etapa 5) es del 92~95%, y el rendimiento es del 88~92%.

En la etapa 5) anterior: el disolvente orgánico para la reacción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en metanol, acetona, acetonitrilo, diclorometano, tolueno, tetrahidrofurano, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente acetona; el volumen del disolvente orgánico puede ser 3~20 veces, preferentemente 10 veces, con respecto al volumen de compuesto 7; la temperatura de reacción puede ser -10~60°C, preferentemente 15~25°C; la razón molar entre el 2,2-dimetoxipropano añadido y el compuesto 7 puede ser de 1:1 a 10:1, preferentemente 2:1; el ácido añadido en una cantidad catalítica puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, p-toluensulfonato de piridinio, ácido p-metilbencenosulfónico, ácido acético y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente p-toluensulfonato de piridinio; la relación en masa entre el ácido añadido en una cantidad catalítica y el compuesto 7 puede ser de 0,01:1 a 0,1:1, preferentemente 0,02:1; el ácido añadido para lavado puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido p-metilbencenosulfónico, ácido acético y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente ácido clorhídrico diluido que tiene una concentración porcentual en masa del 3%; la relación en masa entre el ácido añadido para lavado y el compuesto 7 puede ser de 0,01:1 a 1:1, preferentemente 0,05:1; el álcali añadido para neutralizar el sistema puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio; y el disolvente para extraer después del tratamiento puede seleccionarse de entre

el grupo que consiste en acetato de etilo, éter dietílico, éter metil-terc-butílico, n-heptano, tolueno, xileno y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente acetato de etilo.

El procedimiento específico de la etapa 6) puede comprender lo siguiente. Se añade (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8) y un catalizador metálico a un disolvente orgánico. Se sella el sistema y se desplaza con nitrógeno cinco veces y con hidrógeno tres veces. La reacción se continúa hasta que el compuesto 8 se consume sustancialmente. Se libera la presión y se abre el autoclave. Se toma la mezcla y se aspira. Se lava la torta dos veces con un disolvente orgánico. El producto obtenido por concentración se usa directamente en la siguiente reacción de oxidación. La pureza del producto es del 95-98%, y el rendimiento es del 92-95%.

En la etapa 6) anterior: el disolvente orgánico para la reacción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en metanol, acetona, etanol, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano, tetrahidrofurano, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente acetato de etilo; el volumen del disolvente de la reacción, acetato de etilo, puede ser 3~20 veces, preferentemente 10 veces, con respecto al volumen de compuesto 8; el catalizador metálico añadido puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en hidróxido de paladio, paladio sobre carbono, platino sobre carbono, óxido de platino, Raney-Ni y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente hidróxido de paladio; la relación en masa entre el catalizador metálico añadido y el compuesto 8 puede ser de 0,01:1 a 1:1, preferentemente 0,05:1; y el disolvente para lavar la torta puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en metanol, acetona, etanol, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano, tetrahidrofurano, éter metil-terc-butílico y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente acetato de etilo.

El procedimiento específico de la etapa 7) puede comprender lo siguiente. Se añade 2-((4R,6S)-6-metoxi-2,2-dimetil-[1,3]dioxan-4-il)-acetato (compuesto 9) a un disolvente orgánico. Se enfría la mezcla, seguido por la adición de sulfóxido de dimetilo y una cierta cantidad de un álcali. Se añade un oxidante en porciones. Después de que el compuesto 9 ha reaccionado completamente, se añade agua para inactivar la reacción. Se separa el líquido y la fase acuosa se somete a extracción inversa con un disolvente orgánico. Se combina la fase orgánica, se lava con agua purificada y se concentra para proporcionar el compuesto diana (compuesto de fórmula I). La pureza del producto diana es del 92-96%, y el rendimiento es del 80-85%.

En la etapa 7) anterior: el disolvente orgánico para la reacción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano, tetrahidrofurano, éter metil-terc-butílico, tolueno, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente diclorometano; el volumen del disolvente orgánico para la reacción puede ser 3~20 veces, preferentemente 10 veces, con respecto al volumen de compuesto 9; la razón molar entre el sulfóxido de dimetilo añadido y el compuesto 9 puede ser de 0,01:1 a 20:1, preferentemente 10:1; el álcali añadido puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en trietilamina, piridina, etilendiamina, N,N-diisopropil-etilamina y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente N,N-diisopropil-etilamina; la razón molar entre el álcali añadido y el compuesto 9 puede ser de 1:1 a 50:1, preferentemente 3,5:1; el oxidante añadido puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en hipoclorito de sodio-TEMPO, azufre-trióxido-piridina-sulfóxido de dimetilo, dióxido de manganeso activo, oxidante PCC, oxidante PDC, DMP, preferentemente azufre-trióxido-piridina; la razón molar entre el oxidante añadido y el compuesto 9 puede ser de 0,01:1 a 20:1, preferentemente 10:1; la velocidad a la que se añade el oxidante puede ser de 0,01 kg/h a 1 kg/h, preferentemente 0,4 kg/h; el volumen de agua usado para inactivar la reacción puede ser 3~20 veces, preferentemente 5 veces, con respecto al volumen de compuesto 9; y el disolvente para extracción después del tratamiento puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en acetato de etilo, diclorometano, éter metil-terc-butílico, tolueno, n-heptano y una mezcla de los mismos en cualquier proporción, preferentemente diclorometano.

El procedimiento específico para preparar el acetilacetato de fórmula (5) puede comprender lo siguiente. Se añaden un alcohol (compuesto 10), un disolvente de reacción y un catalizador a un matraz de reacción. Mientras se controla la temperatura del sistema, se añade diceteno gota a gota. Se mantiene la temperatura y se continúa con la reacción hasta que los materiales de partida se hacen reaccionar completamente. El disolvente de la reacción y el exceso de diceteno se eliminan por destilación, y el acetilacetato (compuesto 5) se obtiene por rectificación a presión reducida.

En el procedimiento anterior: el catalizador usado puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en acetato de sodio, piperidina, isopropilamina, 4-dimetilaminopiridina y otro compuesto capaz de catalizar esta clase de reacción; la razón molar entre el catalizador y el alcohol (compuesto 10) puede ser 0,01~0,5:1, preferentemente 0,05~0,10:1; el disolvente de reacción usado puede ser tetrahidrofurano, tolueno o acetonitrilo, o la reacción puede realizarse sin un disolvente; la temperatura de reacción puede ser -10~110°C, preferentemente 10~70°C; la razón molar entre el

diceteno y el alcohol puede ser 0,5-3:1, preferentemente 1-1,2:1; y el compuesto resultante puede purificarse mediante destilación a presión reducida, u otros procedimientos de purificación química conocidos en la técnica.

La reductasa usada en el procedimiento de preparación anterior puede ser cualquier dicetorreductasa existente o un mutante de la misma. En una realización preferida del procedimiento de preparación de la presente descripción, la reductasa es un mutante de dicetorreductasa que comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación:

- a) SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6;
 10 b) una secuencia que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia mostrada en a) y que tiene actividades de dicetorreductasa mejoradas; o
 15 c) una secuencia obtenida por delección, adición y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia mostrada en a) y que tiene actividades de dicetorreductasa mejoradas,

donde la secuencia mostrada en b) no es una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7.

El mutante anterior de dicetorreductasa puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende mutación génica y cribado direccional, usando el gen de la dicetorreductasa (DKR) (mostrado en la SEQ ID NO: 7) de la cepa SK121 de *Rhodococcus erythropolis* como gen de partida. La secuencia de aminoácidos contiene las secuencias siguientes:

(1) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, con el sitio de mutación en F231W:

25 MTELKQITVLGTGVLGSQIAYQTACHGFDVVAYDINAIEVIEKAKARFDSLAAAYKAENV
 EGAKKEGKADEALQRITYSYDLGEAVAKADLVIEAIPEDIAIKRDITYEKLATVAPEHTVFAT
 NSSTLLPSDLKEFTGRPEKFLALHFANHVWVNNNTAEVMGTESTDPAVYREVVEFAKNIG
 MVPIELKKEKAGYVLNSLLVPLLNAASDLLIDGIADPDMVDKTRWIGTGAPWGPFFQIM
 DVVGLTTVYNISSQGGEKQREFADYIKKNYIDEGKLGVAVGDFYNYKG;

(2) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, con los sitios de mutación en I94V+F231W:

30 MTELKQITVLGTGVLGSQIAYQTACHGFDVVAYDINAIEVIEKAKARFDSLAAAYKAENV
 EGAKKEGKADEALQRITYSYDLGEAVAKADLVIEAVPEDIAIKRDITYEKLATVAPEHTVFAT
 TNSSTLLPSDLKEFTGRPEKFLALHFANHVWVNNNTAEVMGTESTDPAVYREVVEFAKNI
 GMVPIELKKEKAGYVLNSLLVPLLNAASDLLIDGIADPDMVDKTRWIGTGAPWGPFFQI
 MDVVGLTTVYNISSQGGEKQREFADYIKKNYIDEGKLGVAVGDFYNYKG;

(3) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, con los sitios de mutación en I94V+V151Q +F231W:

35 MTELKQITVLGTGVLGSQIAYQTACHGFDVVAYDINAIEVIEKAKARFDSLAAAYKAENV
 EGAKKEGKADEALQRITYSYDLGEAVAKADLVIEAVPEDIAIKRDITYEKLATVAPEHTVFAT
 TNSSTLLPSDLKEFTGRPEKFLALHFANHVWQNNNTAEVMGTESTDPAVYREVVEFAKNI
 GMVPIELKKEKAGYVLNSLLVPLLNAASDLLIDGIADPDMVDKTRWIGTGAPWGPFFQI
 MDVVGLTTVYNISSQGGEKQREFADYIKKNYIDEGKLGVAVGDFYNYKG;

(4) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, con los sitios de mutación en V239I+R257K:

MTELKQITVLGTGVLGSQIAYQTACHGFDVVAYDINAIEVIEKAKARFDSLAAAYKAENV
 EGAKKEGKADEALQRITYSYDLGEAVAKADLVIEAIPEDIAIKRDITYEKLATVAPEHTVFAT
 NSSTLLPSDLKEFTGRPEKFLALHFANHVWVNNNTAEVMGTESTDPAVYREVVEFAKNIG
 MVPIELKKEKAGYVLNSLLVPLLNAASDLLIDGIADPDMVDKTRWIGTGAPFGPFQIMDI
 VGLTTVYNISSQGGEKQKEFADYIKKNYIDEGKLGVAVGDFYNYKG;

40 (5) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, con los sitios de mutación en V151Q+R257K:

MTELKQITVLGTGVLGSQIAYQTACHGFDVVAYDINAIEVIEKAKARFDSLAAAYKAENV
 EGAKEGKADEALQRIDADSYDLGEAVAKADLVIEAIPEDIAIKRDTYEKLATVAPEHTVFAT
 NSSTLLPSDLKEFTGRPEKFLALHFANHVWQNNTAEVMGTESTDPAVYREVVEFAKNIG
 5 MVPIELKKEKAGYVLNSLLVPLLNAASDLLIDGIADPDMVDKTRWIGTGAPFGPFQIMD
 VVGLTTVYNISSQGGEKQKEFADYIKKNYIDEGKLGVAVGDFYNYKG; o

(6) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6, con los sitios de mutación en I94V+V151Q:

MTELKQITVLGTGVLGSQIAYQTACHGFDVVAYDINAIEVIEKAKARFDSLAAAYKAENV
 EGAKEGKADEALQRITYSYDLGEAVAKADLVIEAVPEDIAIKRDTYEKLATVAPEHTVFA
 TNSSTLLPSDLKEFTGRPEKFLALHFANHVWQNNTAEVMGTESTDPAVYREVVEFAKNI
 GMVPIELKKEKAGYVLNSLLVPLLNAASDLLIDGIADPDMVDKTRWIGTGAPFGPFQIM
 DVVGLTTVYNISSQGGEKQREFADYIKKNYIDEGKLGVAVGDFYNYKG.

10

Las secuencias de ADN codificantes de los mutantes anteriores de dicetorreductasa incluyen las siguientes secuencias de ADN:

(1) la SEQ ID NO: 9, correspondiente a la secuencia génica de la dicetorreductasa mostrada en la SEQ ID NO: 8 donde TTC en 691-693 pb está mutado en TGG;

(2) la SEQ ID NO: 10, correspondiente a la secuencia génica de la dicetorreductasa mostrada en la SEQ ID NO: 8 donde TTC en 691-693 pb está mutado en TGG y ATT en 280-282 pb está mutado en GTT, GTC, GTA o GTG;

20 (3) la SEQ ID NO: 11, correspondiente a la secuencia génica de la dicetorreductasa mostrada en la SEQ ID NO: 8 donde TTC en 691-693 pb está mutado en TGG, ATT en 280-282 pb está mutado en GTT, GTC, GTA o GTG y GTC en 451-453 pb está mutado en CAA o CAG;

(4) la SEQ ID NO: 12, correspondiente a la secuencia génica de la dicetorreductasa mostrada en la SEQ ID NO: 8 donde GTC en 715-717 pb está mutado en ATT, ATC o ATA y CGC en 769-771 pb está mutado en AAA o AAG;

(5) la SEQ ID NO: 13, correspondiente a la secuencia génica de la dicetorreductasa mostrada en la SEQ ID NO: 8 donde GTC en 451-453 pb está mutado en CAA o CAG y CGC en 769-771 pb está mutado en AAA o AAG; o

30 (6) la SEQ ID NO: 14, correspondiente a la secuencia génica de la dicetorreductasa mostrada en la SEQ ID NO: 8 donde GTC en 451-453 pb está mutado en CAA o CAG y ATT en 280-282 pb está mutado en GTT, GTC, GTA o GTG.

El término "identidad" usado en la presente descripción tiene el significado conocido generalmente en el campo, y las reglas y normas para determinar la identidad de diferentes secuencias son bien conocidas para un experto en la materia. Las secuencias definidas con diferentes niveles de identidad en la presente descripción también deberían tener actividades de dicetorreductasa mejoradas. Los procedimientos y medios para determinar la actividad de una dicetorreductasa y para cribar secuencias mutantes son bien conocidos para un experto en la materia. Dichas secuencias mutantes serían fáciles de obtener para un experto en la materia de acuerdo con las enseñanzas de la descripción en la presente solicitud. En algunas realizaciones, la secuencia del mutante de dicetorreductasa tiene al menos aproximadamente el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6% de identidad con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7 u 8 y tiene o codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una actividad de dicetorreductasa mejorada. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos, tales como uno o varios residuos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 residuos de aminoácidos, en dicha secuencia de aminoácidos pueden experimentar una sustitución de aminoácidos conservadores. Los aminoácidos conservadores son bien conocidos en la técnica.

La expresión "actividad de dicetorreductasa mejorada" usada en la presente memoria significa que la dicetorreductasa obtenida usando la tecnología de mutagénesis de saturación dirigida al sitio tiene una bioactividad mejorada en comparación con la dicetorreductasa inicial, tal como una actividad catalítica mejorada, un perfil de sustrato más amplio, una mayor estabilidad térmica, una mayor estabilidad de pH o una mayor expresión, por ejemplo aumentando al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 150%, 200%, 500% o más en comparación con la dicetorreductasa inicial.

55 Para ilustrar suficientemente la presente descripción, el procedimiento de preparación de la presente solicitud se

verifica en los ejemplos siguientes.

Todos los materiales experimentales en los ejemplos están disponibles comercialmente salvo que se indique lo contrario. Aunque la descripción en los ejemplos de la presente solicitud empieza a partir del compuesto de partida, un experto en la materia comprendería que el procedimiento de los ejemplos de la presente solicitud puede empezar a partir de cualquier producto intermedio y de cualquier etapa en caso de que se disponga de un cierto producto intermedio.

Ejemplo 1: Preparación y cribado de mutante de dicetorreductasa

1. Mutagénesis de saturación dirigida al sitio de dicetorreductasa (DKR) (SEQ ID NO: 7) obtenida de la cepa SK121 de *Rhodococcus erythropolis*

La estructura tridimensional de proteínas de la secuencia de aminoácidos de dicetorreductasa (DKR) se simuló en la página web de Swiss-Model, y la unión entre el sustrato y la proteína se simuló por Docking, y los aminoácidos que pueden correlacionarse con la unión entre el sustrato y NAD y con la transferencia de protones de NAD se seleccionaron finalmente como aminoácidos mutantes a través del análisis Pymol.

Basándose en los aminoácidos mutantes y en las secuencias de bases de los dos lados de los mismos (para los aminoácidos mutantes, véanse los sitios de mutación en la Tabla 1), se diseñaron cebadores mutantes correspondientes con Primer5.0 (Tabla 1). Usando el vector de expresión pET22b(+) que comprende el gen de dicetorreductasa (adquirido de Novagen, nº catálogo 69744) como plantilla, se obtuvieron segmentos lineales completos a través de PCR de plásmidos completos. El producto de PCR anterior, después de ser digerido con DpnI para eliminar la plantilla de origen, fue transformado en BL21 (DE3) de *Escherichia coli*, recubierto en placas de cultivo LB que comprendían 50 µg/ml de ampicilina y cultivado durante toda la noche a 37°C.

Tabla 1. Secuencias de cebadores para mutagénesis de saturación dirigida al sitio

SEQ ID NO.	Sitios de mutación	Nombre de cebador	Secuencias de cebador
15	I94	I94-Directo	GGTCATCGAGGCCANNNCCCGAGGACATCG
16		I94-Inverso	CGATGTCCCTCGGGNNNTGCCTCGATGACC
17	E96	E96-Directo	GTCATCGAGGCAATTCNNNGACATCGCCATCAAGCG
18		E96-Inverso	CGCTTGATGGCGATGTCNNNGGGAATTGCCTCGATGAC
19	R102	R102-Directo	GAGGACATCGCCATCAAGNNNGACACCTACGAGAAGCTTG
20		R102-Inverso	CAAGCTTCTCGTAGGTGTCNNNCTTGATGGCGATGTCCTC
21	T124	T124-Directo	CTACCAACTCCTCGNNNCTGCTGCCGAGCG
22		T124-Inverso	CGCTCGGCAGCAGNNNCGAGGAGTTGGTAG
23	S123	S123-Directo	CGCTACCAACTCCNNNACGCTGCTGCCGAG
24		S123-Inverso	CTCGGCAGCAGCGTNNNGGAGTTGGTAGCG
25	H148	H148-Directo	CACTTCGCAAATNNNGTGTGGGTCAAC
26		H148-Inverso	GTTGACCCACACNNNATTTGCGAAGTG G
27	V151Q	V151-Directo	CAAATCACGTGTGGNNNAACAACACTGCC
28		V151-Inverso	GGCAGTGTGTTNNNCCACACGTGATTTG
29	E156	E156-Directo	CAACAACACTGCCNNNGTCATGGGCACCG
30		E156-Inverso	CGGTGCCCATGACNNNGGCAGTGTGTTG
31	K189	K189-Directo	GAACTCAAGAAGGAGNNNGCGGGCTACGTACTC
32		K189-Inverso	GAGTACGTAGCCCGCNNNCTCCTTCTTGAGTTC
33	G191	G191-Directo	GAACTCAAGAAGGAGAAGGCGNNNTACGTACTCAACTCG C
34		G 191-Inverso	GCGAGTTGAGTACGTANNNCGCCTTCTCCTTCTTGAGTTC
35	L194	L194-Directo	CGGGCTACGTANNNAACTCGCTCCTGG
36		L194-Inverso	CCAGGAGCGAGTTNNNTACGTAGCCCCG
37	W223	W223-Directo	GGTCGACAAGACGNNNCGTATCGGCACCGG
38		W223-Inverso	CCGGTGCCGATACGNNNCGTCTTGCGACC
39	F231	F231-Directo	TATCGGCACCGGAGCCCCGNNNGCCCTTCCAGATCATG
40		F231-Inverso	CATGATCTGGAAGGGCCNNNCGGGGCTCCGGTGCCGATA
41	M237	M237-Directo	GCCCCTTCCAGATCANNNGACGTCGTCGGGTTG
42		M237-Inverso	CAACCCGACGACGTCNNNGATCTGGAAGGGGC
43	V239	V239-Directo	CTTCCAGATCATGGACNNNGTCGGGTTGACCAC

44		V239-Inverso	GTGGTCAACCCGACNNNGTCCATGATCTGGAAG
45	V240	V240-Directo	GATCATGGACGTCNNNGGTTGACCAC
46		V240-Inverso	GTGGTCAACCCNNNGACGTCCATGATC
47	N247	N247-Directo	GACCACCGTCTACNNNATCTCCTCCCAGG
48		N247-Inverso	CCTGGGAGGAGATNNNGTAGACGGTGGTC
49	Q251	Q251-Directo	CAACATCTCCTCCNNNGGCGGCGAGAAGC
50		Q251-Inverso	GCTTCTCGCCGCCNNNGGAGGAGATGTTG
51	R257	R257-Directo	CCCAGGGCGGCGAGAAGCAGNNNGAATTGCCGACTACA TCAAG
52		R257-Inverso	CTTGATGTAGTCGGCGAATTCNNNCTGCTTCTCGCCGCCCT GGG
53	L273	L273-Directo	CATCGACGAGGGCAAGNNNGCGTTGCTGTGTC
54		L273-Inverso	GACAGCAACGCCNNNCTTGCCCTCGTCGATG
55	A276	A276-Directo	CGAGGGCAAGCTCGGCGTTNNNGTCGGCGACGGCTTCTAC
56		A276-Inverso	GTAGAAGCCGTGCGCCGACNNNAACGCCGAGCTTGCCCTCG

2. Cribado preliminar de mutantes de dicetorreductasa

Se seleccionaron colonias individuales en las placas de cultivo descritas anteriormente en la etapa 1 y se inocularon en una placa de 96 pocillos en profundidad, con la adición previa en cada pocillo de 0,5 ml de medio de cultivo líquido LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina. Después de oscilación y cultivo a 37°C durante 3 h, se añadió IPTG con una concentración final de 0,2 mM, y se indujo la expresión a 18°C durante 16 h. Se recogieron los talos centrifugando a 6.000 g durante 10 min, y se rompieron las células con un aparato de sonicación (JY92-2D, Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd). Se obtuvo un sobrenadante por centrifugación a 10.000 g durante 20 min a 4°C, y se sometió a cribado preliminar para determinar su actividad con un lector de microplacas. Se añadieron 30 µL de DMSO, 1,5 µL del material de partida principal, 6-benciloxi-3,5-dioxo-hexanoato de terc-butilo (30 mg/mL en DMSO), 2,5 µL de NADH (20 mg/mL) y 216 µL de tampón de fosfato (100 mM, pH = 6,0) en la placa de 96 pocillos, y se detectó el valor de fondo a 340 nm. A continuación se añadieron a cada pocillo 50 µL de líquido enzimático mutante que se preparó con antelación, e inmediatamente se detectó el cambio en la absorbancia a 340 nm y a 30°C.

La ecuación para calcular la actividad enzimática es la siguiente:

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mL}) = (\Delta A \times 60 \times V_1) / (6,22 \times t \times V_2)$$

donde:

ΔA: cambio en la absorbancia durante la reacción;

V₁: volumen total del sistema de reacción;

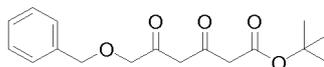
6,22: coeficiente de extinción;

t: tiempo al que se detecta ΔA;

V₂: volumen del líquido enzimático añadido.

3. Cribado secundario de mutantes de dicetorreductasa

Se inocularon los mutantes en la etapa 2 que tenían actividades enzimáticas más acusadas que la enzima progenitora en 500 ml de medio de cultivo líquido LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina. Después de oscilación y cultivo a 37°C hasta DO₆₀₀ = 0,6, se añadió IPTG con una concentración final de 0,2 mM, y se indujo la expresión a 18°C. Después de 16 h, se recogieron los talos centrifugando a 6.000 g durante 10 min. Los talos se rompieron con un aparato de sonicación (JY92-2D, Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd). Se obtuvo un sobrenadante centrifugando a 10.000 g durante 20 min a 4°C, que se usó para detección de actividad. Se añadieron 0,05 g del material de partida principal,



(6-benciloxi-3,5-dioxo-hexanoato de terc-butilo), y 0,5 ml de polietilenglicol PEG-400 en un matraz de reacción de 10 ml. Después de que los materiales de partida se disolvieron, se añadieron 4,0 ml de tampón de fosfato (100 mM, pH

= 6,0), y el material de partida principal se dispersó uniformemente en el tampón; se añadieron 1,5 mg de NAD⁺, 20,6 mg de formiato de amonio, 10 mg de formiato de coenzima deshidrogenasa y 0,5 ml de dicetorreductasa, y el sistema tenía pH = 6,0. Después de mantener la temperatura a 30 ± 3°C durante 16 h, se vigilaron las muestras con cromatografía de capa fina (TLC). Se seleccionaron los sistemas con punto de transformación diferenciado y punto vago del material de partida principal y se extrajeron con acetato de etilo. Después de dejarlo reposar, se separó el líquido, y se tomó la fase orgánica para análisis HPLC.

Se seleccionaron para secuenciación los mutantes que tenían actividades catalíticas más acentuadas que la enzima progenitora con el fin de analizar los sitios de mutación, y para cultivo a mayor escala. Con una nueva prueba de las actividades catalíticas, se determinó que los mutantes F231W (SEQ ID NO: 1), I94V+F231W (SEQ ID NO: 2), I94V+V151Q+F231W (SEQ ID NO: 3), V239I+R257K (SEQ ID NO: 4), V151Q+R257K (SEQ ID NO: 5) e I94V+V151Q (SEQ ID NO: 6) tenían actividades catalíticas significativamente superiores que la enzima progenitora. Los resultados del cribado secundario se muestran en la Tabla 2. Mediante simulación y análisis de la estructura tridimensional de la dicetorreductasa con un software informático, se determinó que I94 estaba situado en la región de unión a NAD, y cuatro aminoácidos V151, F231, V239 y R257 estaban cerca del sitio de unión al sustrato. Los cambios en estos aminoácidos pueden aumentar la especificidad de unión al sustrato, de manera que mejoró la actividad enzimática.

Tabla 2. Comparación de las actividades de la dicetorreductasa progenitora y los mutantes en la preparación de 3R,5S-dihidroxi-6-benciloxi-hexanoato de terc-butilo

SEQ ID NO	Sitio	Cantidad de enzima ^a	de	Conversión	%DE	%EE
1	F231W	3	peso	82,70	87,66	100,00
2	I94V+F231W	2	peso	72,91	89,89	100,00
3	I94V+V151Q+F231W	2	peso	78,31	89,44	100,00
4	V239I+R257K	2	peso	68,26	85,24	100,00
5	V151Q+R257K	2	peso	62,27	88,69	100,00
6	I94V+V151Q	3	peso	68,46	88,14	100,00
7	Cepa progenitora	6	peso	62,26	87,45	100,00

Nota: ^a peso en húmedo de células recombinadas de cada mutante de dicetorreductasa necesarias para convertir 1 g de sustrato; 1peso significa que se necesitó 1 g células húmedas recombinadas de mutante de dicetorreductasa por 1 g de material de partida principal.

4. Clonación y expresión de mutantes de dicetorreductasa

Para facilitar la expresión e identificación de los mutantes de dicetorreductasa, se diseñaron sitios de digestión enzimática restrictivos en los extremos 5' y 3' del gen. Para la digestión enzimática del gen diana puede usarse Nde I y Xho I y pET-22b(+) (pueden usarse también otros plásmidos de expresión que pueden expresar proteínas en *Escherichia coli*) respectivamente y de forma simultánea. Los fragmentos relativamente grandes del gen diana y el plásmido después de la digestión enzimática se ligaron con ADN ligasa T4. El producto ligado se transformó en células competentes de cepas DH5α de *Escherichia coli*. A continuación se recubrieron las células competentes transformadas en una placa de cultivo LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina, y se cultivaron durante toda la noche a 37°C.

Las colonias individuales cultivadas en las placas de cultivo anteriores se seleccionaron e inocularon en un medio de cultivo líquido LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina. Después de oscilación y cultivo durante toda la noche a 37°C, se recogieron los talos para recogida de plásmidos. Después de identificación por PCR e identificación de digestión enzimática doble, los vectores de clonación correctos se nombraron como pET22b(+)-R-M y se transformaron en BL21(DE3) de *Escherichia coli*. Las BL21(DE3) de *Escherichia coli* transformadas se recubrieron en una placa de cultivo LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina, y se cultivaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias individuales en la placa de cultivo anterior se seleccionaron e inocularon en 5 ml de medio de cultivo líquido LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina, y se identificaron con PCR de colonias. Las *Escherichia coli* que comprendían vectores de expresión correctos se sometieron a expresión inducida posterior. El líquido bacteriano anterior se transfirió a 500 ml de medio de cultivo líquido LB que comprendía 50 µg/ml de ampicilina. Después de oscilación y cultivo a 37°C hasta DO₆₀₀ = 0,5~0,6, se añadió IPTG con una concentración final de 0,2~1,0 mM, y la expresión se indujo a 18~25°C durante 10~16 h. Se tomó el líquido bacteriano. Se recogieron los talos centrifugando a 6.000 g durante 10 min, y se almacenó a -20°C para su uso posterior. Los talos se rompieron con un aparato de sonicación (JY92-2D, Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd). Se obtuvieron un sobrenadante y un

precipitado centrifugando a 10.000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se sometió a prueba SDS-PAGE con un sistema de electroforesis vertical. Se demostró que el mutante de dicetorreductasa expresado tenía un peso molecular de aproximadamente 30 kD en SDS-PAGE.

5 Ejemplo 2: Preparación del producto intermedio quiral para su uso en fármacos de estatinas

(1) Síntesis de ácido benciloxiacético (compuesto 3)

Se añadieron 960 g de tetrahidrofurano y 41 g de tolueno en un matraz de reacción. Mientras se controlaba la temperatura del sistema a 10-20°C, se añadieron 534,0 g de hidróxido de potasio en cuatro porciones. Después de completar la adición de hidróxido de potasio, se añadieron 1.371,1 g de alcohol bencilico en el sistema en tres porciones. Se disolvieron 300,1 g de ácido cloroacético en 480,5 g de tetrahidrofurano, y la solución de ácido cloroacético en tetrahidrofurano se añadió gota a gota en el sistema anterior mientras se mantenía la temperatura a 70-80°C. El sistema se hizo reaccionar hasta que el ácido cloroacético se consumió completamente. Después de enfriar el sistema, se añadieron 3,12 kg de agua purificada y se eliminó el tetrahidrofurano a presión reducida. Se extrajo la fase acuosa cuatro veces con tolueno, y se ajustó con ácido clorhídrico a 10-20°C hasta pH 3. Se extrajo la fase acuosa dos veces con éter metil-terc-butílico, y a continuación se concentró para proporcionar 421,3 g de ácido benciloxiacético (compuesto 3). El rendimiento fue del 88,3%, y la pureza GC fue $\geq 99,2\%$.

20 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 12,28 (br, 1H), 7,34-7,30 (m, 5H), 4,59 (s, 2H), 4,12 (s, 2H).

(2) Síntesis de 2-benciloxi-morfolina acetamida (compuesto 4)

Se añadieron 700,5 g de diclorometano y 110,1 g de compuesto 3 en un matraz de reacción. Mientras se controlaba la temperatura del sistema a 10-20°C, se añadieron 575,3 g de cloruro de oxalilo gota a gota. Después de completar la adición de cloruro de oxalilo, se agitó el sistema durante 1 h y se concentró para eliminar sustancias de bajo punto de ebullición. El líquido concentrado se almacena para su uso posterior. Se añadieron 48,0 g de morfolina, 75,5 g de trietilamina y 480,1 g de tolueno en un matraz de reacción. Mientras se controlaba la temperatura a aproximadamente 10°C, el líquido concentrado anterior se añadió gota a gota en el sistema de reacción. Una vez completada la adición, se agitó el sistema durante 1 h. A continuación se añadió ácido clorhídrico diluido para inactivar la reacción. Se separó el líquido. Se lavó la fase orgánica en secuencia con agua, bicarbonato de sodio saturado y agua, y se concentró para proporcionar 116,0 g de 2-benciloxi-morfolina acetamida (compuesto 4). El rendimiento fue del 90,3%, y la pureza HPCL fue $\geq 97,5\%$.

35 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,33-7,28 (m, 5H), 4,56 (s, 2H), 4,14 (s, 2H), 3,63-3,57 (m, 6H), 3,45-3,44 (br, 2H).

(3) Síntesis de acetilacetato de terc-pentilo (compuesto 5a)

Se disolvieron 500 g de alcohol terc-pentílico y 34,6 g de 4-dimetilaminopiridina en 2,5 L de tetrahidrofurano anhidro. Después de enfriar aproximadamente a 5°C, se añadieron 524,3 g de diceteno recién destilado lentamente y gota a gota. Una vez completada la adición, se devolvió la temperatura a aproximadamente 20°C para la reacción hasta que se completó la reacción confirmado por seguimiento TLC. El disolvente y el exceso de diceteno se eliminaron por destilación, y se purificó el material por destilación a presión reducida (5-8 mmHg, 80~90°C) para proporcionar 732,5 g de acetilacetato de terc-pentilo (compuesto 5a). El rendimiento fue del 75,2%, y la pureza GC fue $\geq 98,5\%$.

45 RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6,11 (s, 2H), 3,39 (s, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,81 (q, J = 7,4 Hz, 2H), 1,47 (s, 6H), 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

(4) Síntesis de 6-(benciloxi)-3,5-dioxohexanoato de ciclopentilo (compuesto 6a)

50 Se dispersaron 72,3 g de hidruro de sodio en 1.600,1 g de tetrahidrofurano. Mientras se controlaba la temperatura a aproximadamente 10°C, se añadieron 387,3 g de acetilacetato de terc-pentilo gota a gota. Después de enfriar aproximadamente a -20°C, se añadieron 722,5 mL de n-butil-litio lentamente y gota a gota. Una vez completada la adición, se añadieron adicionalmente 300,3 g de compuesto 4 gota a gota. Una vez completada la reacción confirmado por seguimiento TLC, se añadió ácido clorhídrico diluido en el sistema para inactivar la reacción. Después de separar el líquido, se extrajo la fase acuosa con éter metil-terc-butílico. Se combinó la fase orgánica y se concentró para proporcionar 200,8 g de 6-(benciloxi)-3,5-dioxo-hexanoato de ciclopentilo (compuesto 6a). El rendimiento fue del 70,0%, y la pureza HPCL fue $\geq 98,2\%$.

60 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,32-7,23 (m, 5H), 6,08 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,24 (s, 2H), 3,09 (s, 2H), 1,14-1,02 (m,

8H), 0,88 (t, J = 7,6Hz, 3H).

(5) Síntesis de (3R,5S)-6-(benciloxi)-3,5-dihidroxihexanoato de terc-pentilo (compuesto 7a)

5 Se añadió agua purificada (4,0 mL/g compuesto 6a) y 6-(benciloxi)-3,5-dioxo-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 6a, 1,0 mol) en un matraz de reacción. Después de agitar hasta homogeneidad, se añadió líquido de enzima en bruto de mutante de dicetorreductasa I94V+F231W, formiato de amonio (2,0 mol) y NAD⁺ (0,03 mol), donde la masa del mutante de reductasa fue 0,1 mg/g con respecto a la masa de compuesto 6a. Después de ajustar el pH = 6,2-6,4, se calentó el sistema hasta aproximadamente 30°C, y se mantuvo la temperatura durante aproximadamente 20 h. Una vez completada la reacción, se calentó el sistema hasta 65~70°C para destruir la proteína de enzima. Se añadió acetato de etilo, y se hizo pasar la mezcla a través de un filtro de gel de sílice. Después de separar el líquido, se extrajo la fase acuosa de forma reversible con acetato de etilo. Se combinó la fase orgánica y se concentró para proporcionar el producto (3R,5S)-6-(benciloxi)-3,5-dihidroxihexanoato de terc-pentilo (compuesto 7a). La pureza fue del 95%, el rendimiento fue del 73,1%, el valor ee fue superior al 99,3% y el valor de fue del 93,5%.

15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,37-7,30 (m, 5H), 6,12 (s, 2H), 4,59 (d, J = 7,2Hz, 2H), 4,31 (br, 1H), 4,14 (br, 1H), 3,09 (s, 2H), 1,14-1,02 (m, 8H), 0,88 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

(6) Síntesis de (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8a)

20 Se añadió acetona (10,0 mL/g compuesto 7a), (3R,5S)-6-benciloxi-3,5-dihidroxihexanoato de terc-pentilo (compuesto 7a, 1,0 mol), 2,2-dimetoxipropano (2,0 mol) y una cantidad catalítica de p-toluensulfonato de piridinio (0,02 mol) en un matraz de reacción, y se agitó. El sistema se hizo reaccionar a aproximadamente 20°C hasta que el material de partida (compuesto 7a) se consumió sustancialmente. Se añadió ácido clorhídrico diluido que tenía una concentración porcentual en masa del 3% (0,05 mol) para lavado, seguido por la adición de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio para neutralizar el sistema. Las sustancias de bajo punto de ebullición se eliminaron a presión reducida, seguido por la adición de agua. Después de separar el líquido, se extrajo la fase acuosa dos veces con acetato de etilo. Se combinó la fase orgánica y se lavó una vez con salmuera saturada. Se hizo pasar la fase orgánica a través de un filtro de gel de sílice y se concentró para proporcionar el producto (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8a). La pureza fue del 93,5%, y el rendimiento fue del 90,3%.

35 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,35-7,28 (m, 5H), 6,13 (s, 2H), 4,80 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 4,33-4,28 (m, 1H), 4,12-4,07 (m, 1H), 2,87-2,64 (m, 2H), 1,83-1,79 (m, 2H), 1,37-1,29 (m, 14H), 0,88 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

(7) Síntesis de (4R-cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 9a)

40 Se añadió acetato de etilo (10,0 mL/g compuesto 8a), (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8a, 1,0 mol) y un catalizador metálico de hidróxido de paladio (5%) en un matraz de reacción, y se agitó. Se selló el sistema, seguido por desplazamiento con nitrógeno cinco veces y con hidrógeno tres veces. El sistema se hizo reaccionar a aproximadamente 20°C hasta que el material de partida (compuesto 8a) se consumió sustancialmente. El sistema se desplazó con nitrógeno tres veces, y se liberó la presión. Se aspiró el sistema y se lavó dos veces la torta con acetato de etilo. Se combinaron el sustrato y el líquido de lavado y se concentró hasta sequedad para proporcionar el producto (4R-cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 9a). La pureza del producto fue 96,7%, y el rendimiento fue del 93,9%.

45 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,33-4,26 (m, 1H), 4,01-3,98 (m, 1H), 3,81-3,48 (m, 2H), 2,46-2,30 (m, 2H), 1,79-1,76 (m, 2H), 1,42-1,33 (m, 14H), 0,88 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

50 (8) Síntesis de (4R-cis)-6-formil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 1a)

Se añadió diclorometano (10,0 mL/g compuesto 9a) y 2-((4R,6S)-6-metoxi-2,2-dimetil-[1,3]dioxan-4-il)-acetato (compuesto 9a, 1,0 mol) en un matraz de reacción, y se agitó. El sistema se enfrió hasta -10~0°C, seguido por la adición de sulfóxido de dimetilo (10,0 mol) y N,N-diisopropiletilamina (3,5 mol), y la adición de azufre-trióxido-piridina (3,25 mol) en porciones. Una vez completada la adición, la mezcla se hizo reaccionar mientras se mantenía la temperatura hasta que el compuesto 9a se consumió sustancialmente. A continuación se añadió agua purificada al sistema para inactivar la reacción. Se separó el líquido y se extrajo la fase acuosa de forma reversible una vez con diclorometano. Se combinó la fase orgánica, se lavó con agua purificada y se concentró hasta sequedad para proporcionar el producto de cadena lateral diana (4R-cis)-6-formil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (fórmula 1a). La pureza del producto fue del 93,2%, y el rendimiento fue del 82,5%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 9,58 (s, 1H), 4,34-4,30 (m, 2H), 2,43-2,37 (m, 2H), 2,46-2,30 (m, 2H), 1,57-1,43 (m, 2H), 1,43-1,36 (m, 12H), 0,89 (t, J = 7,8 Hz, 3H).

5 Ejemplo 3: Preparación del producto intermedio quiral para su uso en fármacos de estatinas

(1) Síntesis de ácido benciloxiacético (compuesto 3)

Se añadieron 720,3 g de tetrahidrofurano y 41,1 g de tolueno en un matraz de reacción. Mientras se controlaba la temperatura del sistema a 10-20°C, se añadieron 382,1 g de hidróxido de sodio en cuatro porciones. Una vez completada la adición de hidróxido de sodio, se añadieron 1.371,1 g de alcohol bencilico en el sistema en tres porciones. Se disolvieron 300,2 g de ácido cloroacético en 720,5 g de tetrahidrofurano, y la solución de ácido cloroacético en tetrahidrofurano se añadió gota a gota en el sistema anterior mientras se mantenía la temperatura a 70-80°C. El sistema se hizo reaccionar hasta que el ácido cloroacético se consumió completamente. Después de enfriar el sistema, se añadieron 3,1 kg de agua purificada y se eliminó el tetrahidrofurano a presión reducida. Se extrajo la fase acuosa cuatro veces con tolueno, y se ajustó con ácido clorhídrico a 10-20°C hasta pH 3,2. Se extrajo la fase acuosa dos veces con éter metil-terc-butílico, y a continuación se concentró para proporcionar 410,5 g de ácido benciloxiacético (compuesto 3). El rendimiento fue del 86,2%, y la pureza GC fue ≥ 99,1 %.

20 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 12,28 (br, 1H), 7,34-7,30 (m, 5H), 4,59 (s, 2H), 4,12 (s, 2H).

(2) Síntesis de 2-benciloxi-morfolina acetamida (compuesto 4)

Se añadieron 700,0 g de tolueno y 110,1 g de compuesto 3 en un matraz de reacción. Mientras se controlaba la temperatura del sistema a 10-20°C, se añadieron 557,3 g de cloruro de tionilo gota a gota. Una vez completada la adición de cloruro de tionilo, se agitó el sistema durante 1 h y se concentró para eliminar sustancias de bajo punto de ebullición. El líquido concentrado se almacena para su uso posterior. Se añadieron 48,0 g de morfolina, 75,1 g de trietilamina y 480,0 g de tolueno en un matraz de reacción. Mientras se controlaba la temperatura a aproximadamente 15°C, el líquido concentrado anterior se añadió gota a gota en el sistema de reacción. Una vez completada la adición, se agitó el sistema durante 1 h. A continuación se añadió ácido clorhídrico diluido para inactivar la reacción. Se separó el líquido. Se lavó la fase orgánica en secuencia con agua, bicarbonato de sodio saturado y agua, y se concentró para proporcionar 116,3 g de 2-benciloxi-morfolina acetamida (compuesto 4). El rendimiento fue del 90,2%, y la pureza HPCL fue ≥ 97,5%.

35 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,33-7,28 (m, 5H), 4,56 (s, 2H), 4,14 (s, 2H), 3,63-3,57 (m, 6H), 3,45-3,44 (br, 2H).

(3) Síntesis de acetilacetato de terc-pentilo (compuesto 5a)

Se disolvieron 500,0 g de alcohol terc-pentílico y 34,6 g de 4-dimetilaminopiridina en 2,5 L de tetrahidrofurano anhidro. Después de enfriar aproximadamente a 5°C, se añadieron 524,2 g de diceteno recién destilado lentamente y gota a gota. Una vez completada la adición, se devolvió la temperatura a aproximadamente 15°C para la reacción hasta que se completó la reacción confirmado por seguimiento TLC. El disolvente y el exceso de diceteno se eliminaron por destilación, y se purificó el material por destilación a presión reducida (5-8 mmHg, 80~90°C) para proporcionar 732,2 g de acetilacetato de terc-pentilo (compuesto 5a). El rendimiento fue del 75,3%, y la pureza GC fue ≥ 98,5%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,11 (s, 2H), 3,39 (s, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,81 (q, J = 7,4 Hz, 2H), 1,47 (s, 6H), 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

50 (4) Síntesis de 6-(benciloxi)-3,5-dioxohexanoato de ciclopentilo (compuesto 6a)

Se dispersaron 144,6 g de hidróxido de sodio en 1.600,2 g de tetrahidrofurano. Mientras se controlaba la temperatura a aproximadamente 10°C, se añadieron 387,5 g de acetilacetato de terc-pentilo gota a gota. Después de enfriar aproximadamente a -20°C, se añadieron 722 mL de diisopropiletil-litio lentamente y gota a gota. Una vez completada la adición, se añadieron además 300,2 g de compuesto 4 gota a gota. Una vez completada la reacción confirmado por seguimiento TLC, se añadió ácido clorhídrico diluido en el sistema para inactivar la reacción. Después de separar el líquido, se extrajo la fase acuosa con éter metil-terc-butílico. Se combinó la fase orgánica y se concentró para proporcionar 194,8 g de 6-(benciloxi)-3,5-dioxo-hexanoato de ciclopentilo (compuesto 6a). El rendimiento fue del 68,2%, y la pureza HPCL fue ≥ 98,3%.

60

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,32-7,23 (m, 5H), 6,08 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,24 (s, 2H), 3,09 (s, 2H), 1,14-1,02 (m, 8H), 0,88 (t, J = 7,6Hz, 3H).

(5) Síntesis of(3R,5S)-6-(benciloxi)-3,5-dihidroxihexanoato de terc-pentilo (compuesto 7a)

5

Se añadió agua purificada (4,0 mL/g compuesto 6a) y 6-(benciloxi)-3,5-dioxo-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 6a, 1,0 mol) en un matraz de reacción. Después de agitar hasta homogeneidad, se añadió líquido de enzima en bruto de mutante de dicetorreductasa I94V+V151Q+F231W, formiato de amonio (2,0 mol) y NAD⁺ (0,03 mol), donde la masa del mutante fue 0,1 mg/g con respecto a la masa de compuesto 6a. Después de ajustar el pH = 6,2-6,4, se calentó el sistema hasta aproximadamente 30°C, y se mantuvo la temperatura durante aproximadamente 20 h. Una vez completada la reacción, se calentó el sistema hasta 65~70°C para destruir la proteína de enzima. Se añadió acetato de etilo, y se hizo pasar la mezcla a través de un filtro de gel de sílice. Después de separar el líquido, se extrajo la fase acuosa de forma reversible con acetato de etilo. Se combinó la fase orgánica y se concentró para proporcionar el producto (3R,5S)-6-(benciloxi)-3,5-dihidroxihexanoato de terc-pentilo (compuesto 7a). La pureza fue del 93,1%, el rendimiento fue del 73,2%, el valor ee fue superior al 99,3% y el valor de fue del 92,8%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,37-7,30 (m, 5H), 6,12 (s, 2H), 4,59 (d, J = 7,2Hz, 2H), 4,31 (br, 1H), 4,14 (br, 1H), 3,09 (s, 2H), 1,14-1,02 (m, 8H), 0,88 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

20 (6) Síntesis de (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8a)

Se añadió acetona (10,0 mL/g compuesto 7a), (3R,5S)-6-benciloxi-3,5-dihidroxihexanoato de terc-pentilo (compuesto 7a, 1,0 mol), 2,2-dimetoxipropano (2,0 mol) y una cantidad catalítica de ácido clorhídrico (0,02 mol) en un matraz de reacción, y se agitó. El sistema se hizo reaccionar a aproximadamente 25°C hasta que el material de partida compuesto 7a se consumió sustancialmente. Se añadió ácido clorhídrico diluido que tenía una concentración porcentual en masa del 3% (0,05 mol) para lavado, seguido por la adición de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio para neutralizar el sistema. Las sustancias de bajo punto de ebullición se eliminaron a presión reducida, seguido por la adición de agua. Después de separar el líquido, se extrajo la fase acuosa dos veces con acetato de etilo. Se combinó la fase orgánica y se lavó una vez con salmuera saturada. Se hizo pasar la fase orgánica a través de un filtro de gel de sílice y se concentró para proporcionar el producto (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8a). La pureza fue del 94,0%, y el rendimiento fue del 90,2%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,35-7,28 (m, 5H), 6,13 (s, 2H), 4,80 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 4,33-4,28 (m, 1H), 4,12-4,07 (m, 1H), 2,87-2,64 (m, 2H), 1,83-1,79 (m, 2H), 1,37-1,29 (m, 14H), 0,88 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

(7) Síntesis de (4R-cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 9a)

Se añadió acetato de etilo (10,0 mL/g compuesto 8a), (4R-cis)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 8a, 1,0 mol) y un catalizador metálico de hidróxido de paladio (5%) en un matraz de reacción, y se agitó. Se selló el sistema, seguido por desplazamiento con nitrógeno cinco veces y con hidrógeno tres veces. El sistema se hizo reaccionar a aproximadamente 25°C hasta que el material de partida compuesto 8a se consumió sustancialmente. El sistema se desplazó con nitrógeno tres veces, y se liberó la presión. Se aspiró el sistema y se lavó dos veces la torta con acetato de etilo. Se combinaron el sustrato y el líquido de lavado y se concentró hasta sequedad para proporcionar el producto (4R-cis)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 9a). La pureza del producto fue del 96,3%, y el rendimiento fue del 92,6%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,33-4,26 (m, 1H), 4,01-3,98 (m, 1H), 3,81-3,48 (m, 2H), 2,46-2,30 (m, 2H), 1,79-1,76 (m, 2H), 1,42-1,33 (m, 14H), 0,88 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

50

(8) Síntesis de (4R-cis)-6-formil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (compuesto 1a)

Se añadió diclorometano (10,0 mL/g compuesto 9a) y 2-((4R, 6S)-6-metoxi-2,2-dimetil-[1,3]dioxan-4-il)-acetato (compuesto 9a, 1,0 mol) en un matraz de reacción, y se agitó. El sistema se enfrió hasta -10~0°C, seguido por la adición de sulfóxido de dimetilo (10 mol) y trietilamina (3,5 mol), y la adición de azufre-trióxido-piridina (3,25 mol) en porciones. Una vez completada la adición, la mezcla se hizo reaccionar mientras se mantenía la temperatura hasta que el compuesto 9a se consumió sustancialmente. A continuación se añadió agua purificada al sistema para inactivar la reacción. Se separó el líquido y se extrajo la fase acuosa de forma reversible una vez con diclorometano. Se combinó la fase orgánica, se lavó con agua purificada, y se concentró hasta sequedad para proporcionar el producto de cadena lateral diana (4R-cis)-6-formil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de terc-pentilo (fórmula 1a).

60

La pureza del producto fue del 95,1%, y el rendimiento fue del 82,7%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 9,58 (s, 1H), 4,34-4,30 (m, 2H), 2,43-2,37 (m, 2H), 2,46-2,30 (m, 2H), 1,57-1,43 (m, 2H), 1,43-1,36 (m, 12H), 0,89 (t, J = 7,8 Hz, 3H).

5

Ejemplo 4: Preparación del producto intermedio quiral para su uso en fármacos de estatinas

El procedimiento de preparación fue similar al del Ejemplo 1, con la salvedad de que el acetilacetato es acetilacetato de ciclopentilo. El procedimiento de preparación comprende las etapas siguientes: se enfriaron 500,0 g de alcohol ciclopentílico y 20,5 g de isopropilamina a aproximadamente 5°C, seguido por la adición de 500,0 g de diceteno recién destilado lentamente y gota a gota. Una vez completada la adición, se calentó el sistema hasta 60~70°C para la reacción hasta que se completó la reacción confirmado por seguimiento TLC. El sistema se enfría a menos de 40°C, seguido por eliminación del exceso de diceteno por destilación para proporcionar 790,5 g de acetilacetato de ciclopentilo (compuesto 5b). El rendimiento fue del 80,2%, y la pureza GC fue ≥ 97,5%.

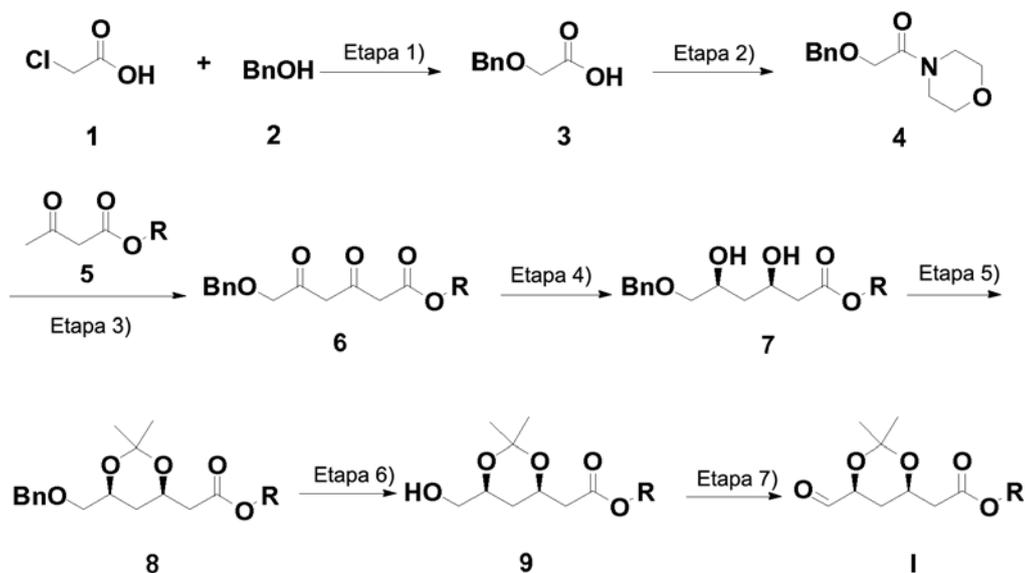
15

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 5,22 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 3,40 (s, 2H), 2,25 (s, 3H), 1,91-1,79 (m, 2H), 1,78-1,66 (m, 5H), 1,65-1,53 (m, 2H).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un producto intermedio quiral de fórmula (I) para su uso en fármacos de estatinas, **caracterizado porque** el procedimiento comprende las etapas siguientes:
- 5 1) realización de una reacción de eterificación usando ácido cloroacético (1) y alcohol bencílico (2) como materiales de partida para producir ácido benciloxiacético (3);
- 2) realización de una reacción de condensación de ácido benciloxiacético (3) con morfolina para producir 2-10 benciloximorfolina acetamida (4);
- 3) realización de una reacción de sustitución de 2-benciloximorfolina acetamida (4) con un éster de acetilacetato de fórmula (5) para producir un producto intermedio de dicetona de fórmula (6);
- 15 4) realización de una reducción asimétrica del producto intermedio de dicetona de fórmula (6) para producir un producto intermedio de diol quiral de fórmula (7);
- 5) reacción del producto intermedio de diol quiral de fórmula (7) con 2,2-dimetoxipropano para producir éster de (4*R*-20 *cis*)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (8);
- 6) eliminación del grupo bencilo del éster de (4*R*-*cis*)-6-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (8) para proporcionar éster de (4*R*-*cis*)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (9); y
- 7) realización de una reacción de oxidación del éster de (4*R*-*cis*)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4-hexanoato de fórmula (9) para proporcionar el producto intermedio quiral de fórmula (I),

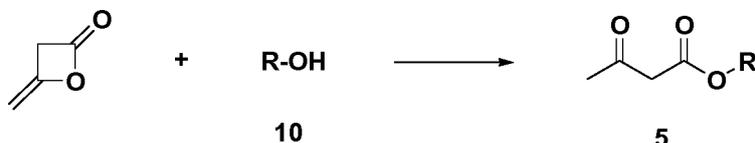
donde el esquema de reacción es el siguiente:



30 donde R representa alquilo C4-C10, ciclopentilo o ciclohexilo.

2. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 1, donde R representa terc-butilo, terc-pentilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

35 3. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde el acetilacetato de fórmula (5) se prepara a través de reacción de adición por apertura de anillo entre diceteno y un alcohol de fórmula (10); donde el esquema de reacción es el siguiente:



4. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la reducción asimétrica en la etapa 4) comprende: la dispersión uniforme del producto intermedio de dicetona de fórmula (6) en un disolvente, la adición de una reductasa, ácido fórmico o una sal de formiato y NAD^+ , el ajuste del valor de pH a 6,2-6,4, a continuación el calentamiento del sistema hasta 27~33°C y el mantenimiento de la temperatura durante 17-24 h.
- 10 5. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4, donde la relación en masa entre la reductasa y el producto intermedio de dicetona de fórmula (6) es 0,00005-0,004:1.
6. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 5, donde la reductasa es un mutante de dicetorreductasa que comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación:
- 15 a) SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6;
- b) una secuencia que tiene una identidad de al menos el 70% con una secuencia mostrada en a) y que tiene actividades de dicetorreductasa mejoradas en comparación con la actividad de dicetorreductasa de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7; o
- 20 c) una secuencia obtenida por delección, adición y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia mostrada en a) y que tiene actividades de dicetorreductasa mejoradas en comparación con la actividad de dicetorreductasa de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7,
- 25 donde la secuencia mostrada en b) no es una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7.
7. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 6, donde el mutante de dicetorreductasa comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.
- 30 8. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4, donde el disolvente es uno o más seleccionados de entre el grupo que consiste en agua purificada, polietilenglicol, isopropanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etanol, n-heptano, tolueno, acetona, dimetilformamida y metanol.
- 35 9. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4, donde la sal de formiato se selecciona de entre el grupo que consiste en formiato de amonio, formiato de sodio y formiato de potasio, y la razón molar entre ácido fórmico o sal de formiato y el producto intermedio de dicetona de fórmula (6) es 2~10:1.
10. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4, donde la relación en masa entre
- 40 NAD^+ y el producto intermedio de dicetona de fórmula (6) es 0,001~0,1:1.