

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 312**

51 Int. Cl.:

C12P 41/00 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2013 PCT/US2013/026706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126337**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2013 E 13706896 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2817412**

54 Título: **Proceso para separar diésteres de ciclopropilo**

30 Prioridad:

24.02.2012 US 201261602811 P

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**GOSWAMI, ANIMESH;
GUO, ZHIWEI y
QIU, YUPING**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 714 312 T3

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

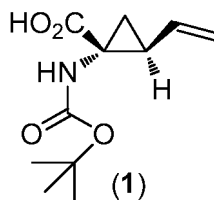
DESCRIPCIÓN

Proceso para separar diésteres de ciclopropilo

- 5 La presente invención proporciona un método para la hidrólisis estereoespecífica de 1,1-dialquiloxicarbonilciclopropanos racémicos.

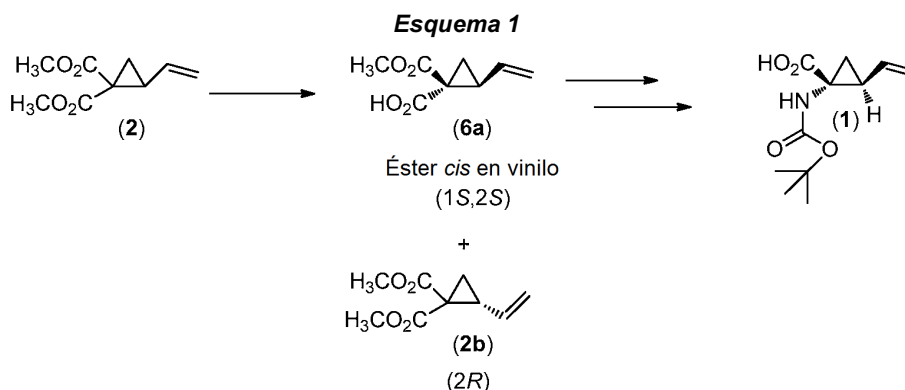
El *Trans*-(1*R*,2*S*)-1-*tert*-butoxicarbonilamino-1-carboxi-2-vinilciclopropano (1) es un importante intermediario quiral para la síntesis de determinados inhibidores de la proteasa del virus de la Hepatitis C.

10



Se han dado a conocer distintos enfoques sintéticos. Fliche, y col. (e.g. Synthetic Communications, vol.24, No 20, 2873-2876) da a conocer una vía quimioenzimática, que implica la separación enzimática del éster de dimetilo racémico (2) para preparar el correspondiente monoácido *cis*-(1*S*,2*S*)-(6a) seguido por conversión química (6a) en el intermediario quiral deseado (1) (*esquema 1*).

15



20

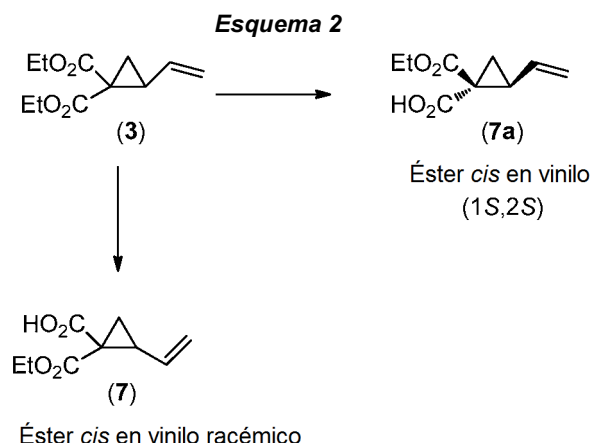
En este enfoque, todas las enzimas evaluadas mostraron solo enantioselectividad moderada e incluso con la mejor enzima, la separación enzimática tuvo que llevarse a cabo dos veces para mejorar el ee a un nivel necesario para la aplicación práctica para la síntesis enantioselectiva de intermediarios farmacéuticos. La hidrólisis enzimática del éster de metilo racémico (2) mediante Carboxil Naproxen esterasa (CENP) proporcionó el monoácido *cis*-(1*S*,2*S*)-(6a) con ee de solo el 70 % y material de partida sin reaccionar enriquecido con el éster de dimetilo (2*R*)-(2b) con ee del 95 %. El monoácido *cis*-(1*S*,2*S*)-(6a) ee del 70 % se reesterificó con el diéster y la segunda hidrólisis enzimática con CENP mejoró el ee del monoácido *cis*-(1*S*,2*S*)-(6a) al 90 %. Una segunda hidrólisis enzimática del éster de dimetilo enriquecido (2*R*)-(2b) ee del 95 % mediante Esterasa 30000 proporcionó el monoácido *cis*-(1*R*,2*R*)-(6a) con un ee del 95 %.

25

30

La hidrólisis catalizada por esterasa de hígado porcino (PLE) del éster de dietilo (±)-(3) también dio a conocer que proporcionaba al monoácido (7a) con una baja diaestereoselectividad (de del 60 %). La hidrólisis no enzimática del éster de dietilo (±)-(3) mostró una diaestereo-preferencia parcial en proporcionar *cis*-(±)-(7) racémico como producto principal.

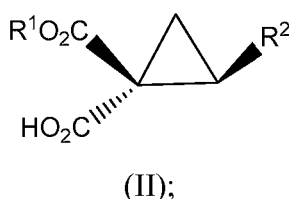
35



Alupey y col. (Macromolecu. Rapid. Commun., vol.22, No 16, 2001) también desvela la hidrólisis enzimática de 1,1-dietoxycarbonil-2-vinilciclopropano. Asimismo, el documento EP 2537825 desvela métodos de producción de (2S)-1,1-dietoxycarbonil-2-vinilciclopropano.

Ejemplos tales como estos señalan la necesidad de encontrar una enzima con una alta diaestereoselectividad y una alta enantioselectividad para la síntesis enantioselectiva práctica de intermediarios farmacéuticos tales como vinilciclopropano (1).

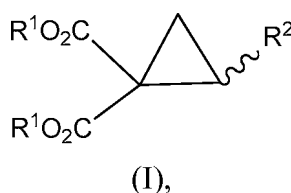
En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (II)



en donde

R¹ es alquilo; y
R² se selecciona entre alquénilo y alquilo;

comprendiendo el proceso:
hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I)



con la enzima de Penicilina V de amidohidrolasa de *Fusarium oxysporum*.

En una primera realización del primer aspecto la Penicilina V amidohidrolasa de la enzima de *Fusarium oxysporum* se obtiene a partir de un organismo recombinante que contiene el gen de la Penicilina V amidohidrolasa de *Fusarium oxysporum*.

En una segunda realización del primer aspecto R¹ es alquilo en donde el alquilo se selecciona entre metilo, etilo, propilo y butilo. En una tercera realización del primer aspecto R² es alquénilo C₂.

En una cuarta realización del primer aspecto el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso diastereomérico igual a o superior al 90 %. En una quinta realización del primer aspecto, el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso diastereomérico del 95 % o superior. En una sexta realización del primer aspecto, el compuesto de fórmula (II) se obtiene un exceso enantiomérico de más del 70 %. En una séptima realización del primer aspecto el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso enantiomérico del 90 % y superior. En una octava realización

del primer aspecto, el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso enantiomérico del 95 % o superior.

La enzima puede usarse como tal o como una enzima inmovilizada. Además, la enzima como tal o en la forma inmovilizada puede volverse a usar.

Tal como se usan en la presente memoria descriptiva, los términos siguientes tienen los significados indicados:

El término "alquenilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de dos a seis átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo obtenido a partir de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono.

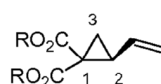
Todos los procesos en la presente divulgación pueden llevarse a cabo como procesos continuos. La expresión "proceso continuo", como se usa en el presente documento, representa etapas que se han llevado a cabo sin aislamiento del intermediario.

Las estructuras de los compuestos relevantes se muestran en los Esquemas 3-5.

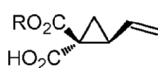
Las abreviaturas utilizadas en la presente solicitud, incluidas particularmente en los esquemas y ejemplos ilustrativos que siguen, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Algunas de las abreviaturas utilizadas son las siguientes: TFA para ácido trifluoroacético; min para minutos; h para horas; DMSO para dimetilsulfóxido; MTBE para *tert*-butil éter de metilo; Et para etilo; n-Pr para n-propilo, n-Bu para n-butilo, t-Bu para *tert*-butilo; y Me para metilo.

Ejemplos

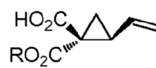
Esquema 3



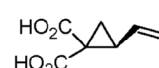
(2S)
2a: R=Me
3a: R=Et
4a: R=*n*-Pr
5a: R=*n*-Bu



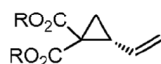
Éster *cis* en vinilo
 (1S,2S)
6a: R=Me
7a: R=Et
8a: R=*n*-Pr
9a: R=*n*-Bu



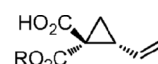
Éster *trans* en vinilo
 (1R,2S)-
10a: R=Me
11a: R=Et
12a: R=*n*-Pr
13a: R=*n*-Bu



(2S)-
14a



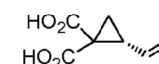
(2R)
2b: R=Me
3b: R=Et
4b: R=*n*-Pr
5b: R=*n*-Bu



Éster *cis* en vinilo
 (1R,2R)
6b: R=Me
7b: R=Et
8b: R=*n*-Pr
9b: R=*n*-Bu



Éster *trans* en vinilo
 (1S,2R)
10b: R=Me
11b: R=Et
12b: R=*n*-Pr
13b: R=*n*-Bu



(2R)-
14b

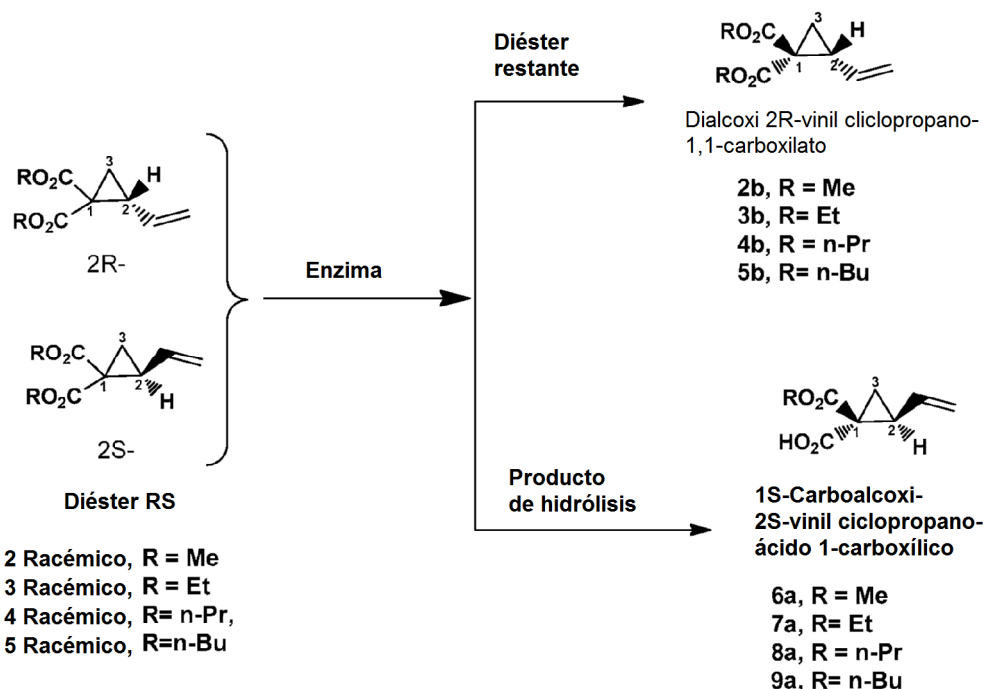
2, 2a+2b Racémico: R=Me
3, 3a+3b Racémico: R=Et
4, 4a+4b Racémico: R=*n*-Pr
5, 5a+5b Racémico: R=*n*-Bu

Los isómeros *cis*- y *trans* se mostraron con distintos números de compuesto.

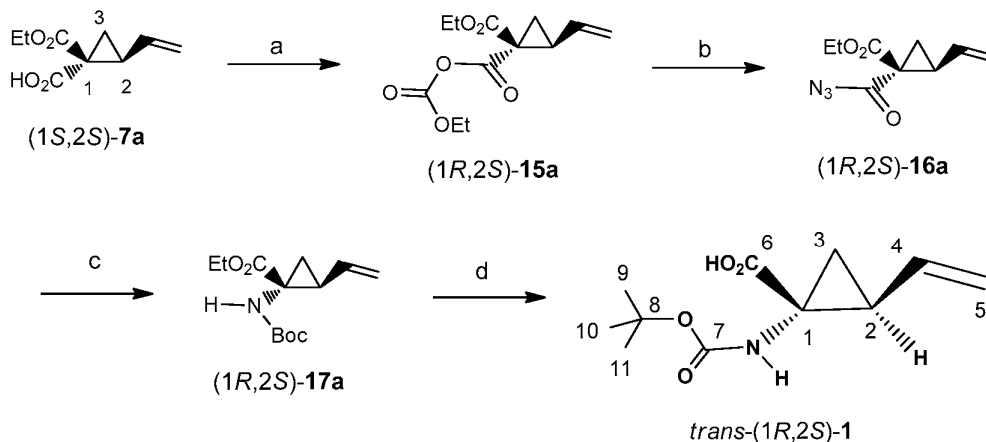
Los enantiómeros se identificaron como **a** y **b** del mismo número (1, 2, 3, 4).

El *cis*- y el *trans*- en el texto representa la relación entre el grupo vinilo y éster.

Esquema 4



Esquema 5



54 % de rendimiento completo de 7a

5

a. ClCO₂Et, Et₃N; b. NaN₃, agua; c. t-BuOH, reflujo; d. LiOH, agua.El prefijo *trans*- representa la relación entre los grupos N-Boc y vinilo en 17a y 1.

10 Los productos químicos se adquirieron de VWR y/o de Aldrich. Se registró el espectro de RMN en CDCl₃ (excepto como se indica) en un espectrofotómetro de RMN BRUKER-300 y/o JEOL-400. Las asignaciones de protones se basaron en experimentos de ¹H-¹H COSY. Los datos de LCMS se registraron en un sistema de LCMS de Shimadzu con método de electropulverización de iones positivos (ES+) o electropulverización de iones negativos (ES-). Los datos de rotación se registraron sobre un polarímetro de Perkin-Elmer 241.

15

El método 1 aquiral de HPLC de fase inversa, y los métodos 2 y 3 quirales se llevaron a cabo con distintos gradientes de disolvente A (0,05 % de TFA en agua:metanol 80:20) y disolvente B (0,05 % de TFA en acetonitrilo:metanol 80:20) a temperatura ambiente con detección UV a 210 nm excepto cuando se indica lo contrario. El método 4 de HPLC de fase normal fue para análisis quiral. Algunas modificaciones de estos métodos de HPLC también se usaron durante el estudio para una mejor separación o un análisis más rápido. El método 1 se usó para el análisis quiral de todos los compuestos y se llevó a cabo sobre una columna YMC-Pack Pro C18 (3 µm, 150 x 4,6 mm) con un caudal de 1 ml/min y un gradiente desde el 30 % hasta el 100 % de disolvente B durante 14 min y manteniendo el 100 % de B durante 2 min adicionales. Los tiempos de retención fueron de 6,1, 8,7, 11,4 y 13,5 min para los diésteres 2, 3, 4 y 5; 4,2, 5,3, 6,7 y 8,1 min para los **monoácidos** cis 6, 7, 8 y 9; 4,0, 5,1, 6,5 y 7,9 min para

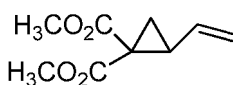
20

los monoácidos *trans* **10**, **11**, **12** y **13**; 3,0 min para el diácido **14**; 8,7 y 12,5 min para el compuesto *trans* **17** y su isómero *cis* **18**; 5,9 min para el compuesto *trans* **1**, respectivamente.

El método 2 se usó para el análisis quiral del compuesto *trans* **17** y se llevó a cabo sobre una columna *Chiralcel* OD-RH (150 x 4,6 mm) con un caudal de 0,5 ml/min y una composición isocrática del 35 % de disolvente B durante 25 min. Los tiempos de retención fueron de 19,1 min para (1*R*,2*S*)-**17a** y 20,6 min para (1*S*,2*R*)-**17b**.

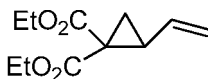
El método 3 se usó para el análisis quiral del compuesto *trans* **1** y se llevó a cabo sobre una columna *Chiralpak* AS-RH (150 x 4,6 mm) con un caudal de 0,5 ml/min y una composición isocrática del 22 % de disolvente B durante 20 min. Los tiempos de retención fueron de 9,1 min para (1*R*,2*S*)-**1** y 11,6 min para su enantiómero (1*S*,2*R*)-**1b**.

El método 4 se usó para el análisis quiral de los monoácidos *cis* de **6** a **9** y se llevó a cabo sobre una columna *Chiralpak* AD-H (250 x 4,6 mm) con un caudal de 1 ml/min y una composición isocrática del 5 % de isopropanol en heptano durante 15 min. Los tiempos de retención fueron de 8,0 y 8,7 min durante **6b** y **6a**; 7,4 y 8,2 para **7b** y **7a**; 6,9 y 7,6 min para **8b** y **8a**; 6,6 y 7,0 min para **9b** y **9a** respectivamente.



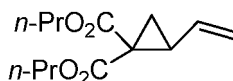
Síntesis de éster de dimetilo racémico (2)

Se añadió a un matraz de 250 ml de (E)-1,4-dibromo-2-buteno (92,6316 mmol, 20,014 g), carbonato potásico (anhídrido, 231,802 mmol, 32,036 g), metanol (anhídrido 100 ml) y malonato de dimetilo (101,8786 mmol, 13,4598 g). La reacción fue exotérmica al inicio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El disolvente se retiró con presión reducida. El resto se trató con 200 ml de acetato de etilo y 200 ml de agua. La capa orgánica se lavó adicionalmente con agua (2 x 100 ml), se secó con MgSO₄, y se filtró. La retirada de disolvente del filtrado proporcionó éster de dimetilo (2) (14,7833 g, 86,6 % de rendimiento). Se obtuvo una muestra analítica pura mediante destilación (89 °C / 5 mmHg). RMN ¹H (CDCl₃) δ 5,43-5,36 (m, 1H), 5,26 (d aparente, *J* = 16,7 Hz, 1H), 5,10 (d aparente, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,703 (s, 3H), 3,700 (s, 3H), 2,55 (q aparente, *J* = 8,5 Hz, 1H), 1,68 (dd, *J* = 7,63, 4,88 Hz, 1H), 1,55 (dd, *J* = 9,16, 4,89 Hz, 1H) ppm. RMN ¹³C (CDCl₃) δ 170,01, 167,78, 133,05, 118,65, 52,68, 52,53, 35,81, 31,43, 20,58 ppm.



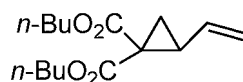
Síntesis de éster de dietilo racémico (3)

Se añadió a un matraz de 250 ml de (E)-1,4-dibromo-2-buteno (92,63 mmol, 20,01 g), carbonato potásico (anhídrido, 231,44 mmol, 31,99 g), etanol (anhídrido 100 ml) y malonato de dietilo (102,00 mmol, 16,34 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 46 h. El mismo procedimiento de trabajo que se usó para preparar éster de dimetilo proporcionó éster de dietilo (3) (20,473 g, 104 % de rendimiento). Se obtuvo una muestra analítica pura mediante destilación (97 °C / 5 mmHg). RMN ¹H (CDCl₃) δ 5,47-5,40 (m, 1H), 5,29 (d aparente, *J* = 17,09 Hz, 1H), 5,13 (d aparente, *J* = 10,1 Hz, 1H), 4,26~4,12 (m, 4H), 2,56 (q aparente, *J* = 8,24 Hz, 1H), 1,68 (dd, *J* = 7,33, 4,89, 1H), 1,54 (dd, *J* = 9,16, 4,89 Hz, 1H), 1,28~1,23 (m, 6H) ppm. RMN ¹³C (CDCl₃) δ 169,69, 167,44, 133,27, 118,39, 61,62, 61,44, 36,04, 31,08, 20,35, 14,23, 14,11 ppm.



Síntesis de éster de dipropilo racémico (4)

Se añadió a un matraz de 250 ml de (E)-1,4-dibromo-2-buteno (92,598 mmol, 20,007 g), carbonato potásico (anhídrido, 231,668 mmol, 32,018 g), 1-propanol (100 ml) y malonato de dipropilo (101,916 mmol, 19,183 g). La mezcla se agitó a 60 °C durante 24 h. El mismo procedimiento de trabajo que se usó para preparar éster de dipropilo proporcionó éster de dietilo (4) (23,069 g, 103,7 % de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ 5,47-5,40 (m, 1H), 5,28 (d aparente, *J* = 17,09 Hz, 1H), 5,12 (d aparente, *J* = 10,38 Hz, 1H), 4,15~4,03 (m, 4H), 2,57 (q aparente, *J* = 8,24 Hz, 1H), 1,70~1,62 (m, 5H), 1,54 (dd, *J* = 8,85, 4,88, 1H), 0,95~0,92 (t aparente, *J* = 7,33 Hz, 6H) ppm. RMN ¹³C (CDCl₃) δ 169,82, 167,57, 133,35, 118,40, 67,26, 67,20, 36,16, 31,13, 22,04, 21,97, 20,47, 10,42, 10,35 ppm.



Síntesis de éster de dibutilo racémico (5)

- 5 Se añadió a un matraz de 250 ml de (E)-1,4-dibromo-2-buteno (92,784 mmol, 20,047 g), carbonato potásico (anhídrido, 231,430 mmol, 31,985 g), 1-butanol (100 ml) y malonato de dibutilo (101,869 mmol, 22,032 g). El procedimiento usado para preparar el éster de dimetilo proporcionó éster de dibutilo (5) (23,933 g, 96,1 % de rendimiento). RMN ^1H (CDCl_3) δ 5,42 (m, 1H), 5,27 (d aparente, $J = 16,78$ Hz, 1H), 5,10 (d aparente, $J = 10,37$ Hz, 1H), 4,17-4,05 (m, 4H), 2,54 (q aparente, $J = 8,54$ Hz, 1H), 1,66 (dd, $J = 7,63$; 4,88 Hz, 1H), 1,62-1,56 (m, 4H), 1,52 (dd, $J = 8,85$; 4,89 Hz, 1H), 1,40-1,32 (m, 4H), 0,93-0,89 (m, 6H), RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 169,80, 167,55, 133,33, 118,34, 65,51, 65,37, 36,12, 34,96, 31,09, 30,69, 30,63, 20,44, 19,10, 13,65, 13,63 ppm.

Detección enzimática

- 15 Se tomaron placas multipocillo que contenían enzimas fuera de la sala fría. Cada pocillo contenía aproximadamente 10 mg de enzima liofilizada o inmovilizada. Tampón fosfato, 100 mM, pH 7 (1 ml) de añadió a cada pocillo. Las placas se agitaron en el Termomezclador R a 600 rpm a 28 °C durante 5 minutos. Se añadió a cada pocillo una solución de 1 μl (1,097 mg) del éster de dimetilo racémico ($\pm$)-(2) en 20 μl de DMSO. Se llevó a cabo la hidrólisis agitando en el mismo agitador a 600 rpm y 28 °C durante 24 h. Después de 24 h, se añadió a cada pocillo acetronitrilo (1 ml). Las mezclas se colocaron en el agitador a 300 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos para mezclar y, a continuación, se filtraron a través de un filtro de 0,2 μm y se analizaron mediante HPLC de fase inversa (Método 1) para determinar el grado de hidrólisis. Las mezclas de reacción de la hidrólisis de enzimas que mostraban más de un 10 % de conversión se analizaron mediante HPLC quiral para determinar las composiciones enantioméricas. A la mezcla de reacción de la hidrólisis enzimática, se añadió 0,1 ml de 1 N de HCl para hacer la mezcla ácida (pH $\sim$ 2,5) y se extrajo con 2 ml de acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se separó y evaporó con un vapor de nitrógeno. El resto se disolvió con heptano-isopropanol (95:5, 1 ml) y se analizó mediante HPLC quiral (Método 4).

Tabla 1

Resultados de detección de hidrólisis enzimática							
Enzima	Origen	Proveedor	Relación de área- HPLC de fase inversa			HPLC quiral*	
			trans- (10a+10b)	cis- (6a+6b)	Diéster (2a+2b)	1 ^{er} Pico (1R,2R)-6b	2 ^o Pico (1S,2S)-6a
Estererasa BS1	<i>Bacillus subtilis</i>	Julich	9 %	70 %	20 %	12,4 %	87,6 %
Estererasa BS2	<i>Bacillus subtilis</i>	Julich	51 %	48 %	1 %	13,1 %	86,9 %
Acilasa I	Riñón porcino	Sigma	29 %	48 %	23 %	57,2 %	42,8 %
Esterasa de hígado porcino	Hígado porcino	Sigma	19 %	81 %	0 %	56,2 %	43,8 %
Lipasa OF	<i>Candida rugosa</i>	Sepracor	19 %	47 %	34 %	72,0 %	28,0 %
Esterasa 30000	Origen bacteriano	Gist Brocades	17 %	57 %	26 %	91,5 %	8,5 %
Lipasa	<i>Mucor miehei</i>	Sigma	5 %	28 %	67 %	94,3 %	5,7 %
Quirazima, L-3,Lyo	<i>Candida rugosa</i>	Boehringer	21 %	31 %	48 %	54,6 %	45,4 %
Lipasa OF	<i>Candida cyllindracea</i>	Meito Sangyo	26 %	70 %	4 %	59,6 %	40,4 %
Lipasa N	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano	0 %	9 %	91 %	93,9 %	6,1 %
Subtilisina Carlsberg	<i>Bacillus globigii</i>	Sigma	11 %	89 %	0 %	53,8 %	46,2 %
QuiroCLEC-BL	<i>Bacillus licheniformis</i>	Altus	8 %	66 %	26 %	52,8 %	47,2 %
Quirazima P1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Boehringer	5 %	38 %	57 %	53,9 %	46,1 %
Seaprosa S	<i>Aspergillus oryzae</i>	Amano	33 %	67 %	0 %	71,9 %	28,1 %
Proteasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma	6 %	42 %	52 %	54,4 %	45,6 %

Proteasa	especie <i>Bacillus</i>	Sigma	0 %	30 %	70 %	61,2 %	38,8 %
Proteasa P "Amano" 6	<i>Aspergillus s melleus</i>	Amano	30 %	61 %	9 %	71,8 %	28,2 %
Pen V Amidasa (invención)	<i>Fusarium oxysporum</i>	BMS**	0 %	73 %	27 %	8,9 %	91,1 %
Proteasa, Tipo XIV	<i>Streptomyces griseus</i>	Sigma	4 %	38 %	58 %	82,2 %	17,8 %
Proteasa M	<i>Aspergillus s oryzae</i>	Amano	6 %	50 %	44 %	22,0 %	78,0 %

* La asignación de los picos HPLC se confirmó mediante conversión de (6a) en el compuesto conocido (1).

** Pen V amidasa de *Fusarium oxysporum* es una amidohidrolasa de penicilina V recombinante inmovilizada usada originalmente para la hidrólisis enzimática de penicilina V en ácido 6-aminopenicilánico y fabricada en por sí mismo por Bristol-Myers Squibb (véase patente de los EE.UU. n.º de serie 5.516.679 y Lowe, D. *et al. Biotechnol. Lett.* 1986, 8, 151-156).

Hidrólisis enzimática del éster de dietilo (±)-3 con Pen V Amidasa para preparar *cis*-(1S,2S)-(7a)

La reacción se llevó a cabo en un matraz de 2 l revestido sobre un STAT de pH para mantener la temperatura a 30 °C y pH 8,0 mediante adición automática de 1 M de NaOH acuoso. Al matraz se cargaron 60 g de Pen V amidasa y 1,5 l de 0,1 M de tampón de fosfato pH 8,0. Con agitación, se añadió el éster de dietilo (±)-3 (30,5 g). Después de 48 h, la tasa de consumo de NaOH indicó la finalización de la hidrólisis. La reacción se finalizó filtrando la mezcla para retirar la enzima. El sólido se lavó con 0,1 M de tampón de fosfato, el pH 8,0 (200 ml) y acetato de etilo (3 x 200 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y se separaron las dos fases. La fase acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 x 600 ml). La fase orgánica combinada se lavó con 300 ml de 5 % de NaHCO₃, 300 ml de agua. La retirada de disolvente a temperatura ambiente proporcionó 16,7 g del éster de dietilo restante (2R)-(3b), rendimiento aislados del 55 %, AP 97, [α]_D = + 23,98 (c=2,16, CHCl₃). RMN (CDCl₃) δ 5,46 (m, 1H), 5,30 (dd, 1H), 5,14 (dd, 1H), 4,19 (m, 4H), 2,58 (c, 1H), 1,69 (m, 1H), 1,56 (m, 1H), 1,27 (dos tripletes, 6H) ppm.

La fase acuosa se acidificó con 4 M de HCl y se extrajo con acetato de etilo (3 x 600 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y lavaron con agua. La retirada con disolvente en un evaporador giratorio a 20-25 °C proporcionó 10,3 g de producto *cis*-(1S,2S)-(7a), rendimiento aislado del 39 %, AP 98, de del 99 % y ee del 90 %, [α]_D = + 5,52 (c=2,82, CHCl₃). RMN (CDCl₃) ¹H δ 11,35 (amplio, 1H), 5,68 (m, 1H), 5,43 (d, J= 16,9 Hz, 1H), 5,25 (d, J= 10,1 Hz, 1H), 4,30 (m, 2H), 2,75 (c, J= 8,6 Hz, 1H), 1,95 (m, 2H), 1,32 (t, J= 7,1 Hz, 3H) ppm.

Reacción Curtius modificada que convierte *cis*-(1S,2S)-(7a) en *trans*-(1R,2S)-(17a)

A una solución de *cis*-(1S,2S)-(7a) (3,684 g, de del 99 %, ee del 90 %) en acetona (50 ml, secada sobre tamiz molecular) a -5 a 0 °C se añadió trietilamina (3,35 ml) seguido por adición a gotas de una solución de cloro formato de etilo (2,49 ml) en 10 ml de acetona secada. Después de 30 min a -5 a 0 °C, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El precipitado de color blanco formado se retiró mediante filtración. El filtrado se enfrió a -5 °C y se añadió a gotas una solución de azida de sodio (1,95 g) en 10 ml de agua. La mezcla se agitó a -5 a 0 °C durante 1 h. A la mezcla se añadieron 100 ml de agua fría (5 °C). La mezcla se extrajo con MTBE (3 x 80 ml). La fase de MTBE se secó sobre MgSO₄, y se filtró. La retirada con disolvente en un evaporador giratorio a 20-25 °C proporcionó 4,118 g de azida de color amarillo claro (16a), un rendimiento completo del 98 %.

Se sometió a reflujo una mezcla de azida (16a) en 50 ml de *t*-butanol anhidrido durante 18 h (100 °C de baño con aceite). La mezcla se concentró hasta sequedad con presión reducida para proporcionar 4,259 g de producto de color amarillo claro de *trans*-(1R,2S)-(17a), AP 78, de > 99 %, ee del 90 %, rendimiento completo del 83 % de (7a).

Hidrólisis de *Trans*-(1R,2S)-(17a) en *Trans*-(1R,2S)-(1)

Una mezcla del producto bruto (17a) obtenido en la última sección, 10 ml de YHF y 40 ml de 2 M de LiOH acuoso se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla se extrajo con 100 ml de MTBE. La fase de MTBE se extrajo al revés con 20 ml de agua. La fase acuosa combinada se acidificó con una mezcla de KHSO₄ (10,9 g) y agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). El extracto de acetato de etilo se lavó con salmuera (2x50 ml), agua (2x50 ml), se secó sobre MgSO₄, y se filtró. La retirada con disolvente a temperatura ambiente proporcionó 3,192 g de producto bruto, AP 77. El producto bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida (80 g de gel de sílice) y se eluyó con heptano-etilo acetato-ácido acético (50:50:1) para proporcionar 2,448 g (54 % de rendimiento completo de (7a)) de *trans*-(1R,2S)-(1) de color blanco sólido, AP 95, ee del 90 %, [α]_D +22,34 (c 1,41, MeOH). LCMS m/z 226 (M-H) mediante método de ES- y 250 (M+Na) mediante método de ES+. Los espectros RMB ¹H, ¹H-¹H COSY, ¹³C y DEPT de (1) se registraron en DMSO-*d*₆. La asignación de protones se basó en ¹H-¹H COSY y la asignación de carbono se basó en experimentos DEPT. ¹H δ 12,41 (amplio, 1H, CO₂H), 7,52 (amplio, 0.74H, NH del rotámero principal), 7,18 (amplio, 0.26H, NH del rotámero secundario), 5,67 (m, 1H, 4-CH), 5,21 (d, J= 15,8 Hz, 1H, 5-CH₂-A), 5,02 (d, J= 10,3 Hz, 1H, 5-CH₂-B), 2,02 (m, 1H, 2-CH), 1,49 (m, 1H, 3-CH₂-A), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,22 (m, 1H, 3-CH₂-B) ppm. ¹³C

del rotámetro principal δ 172,41 (C-6), 155,51 (C-7), 134,95 (C-4 arriba en DEPT), 116,78 (C-5 abajo en DEPT), 77,95 (C-8), 39,92 (C-1 no se muestra en DEPT), 32,45 (C-2 arriba en DEPT), 28,18 (C-9, 10 y 11 arriba en DEPT), 22,52 (C-3 abajo en DEPT) ppm.

5 Procedimiento general para hidrólisis enzimática en pequeños viales

A cada vial (4 ml) se cargó Pen V Amidasa (10 mg o como se indica) y 1 ml de un tampón. El vial se coloca en el pocillo de una placa multipocillo y se agita en un agitador Termomezclado. Después de 10 min, se añadió 10 μ l del sustrato diéster (**2**, **3**, **4** o **5**) o como se indicó y se continuó la agitación. Después de 24 h o el tiempo indicado, se añadieron 20 μ l de 4 M de HCl y 3 ml de acetonitrilo. La mezcla se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m. 1 ml del filtrado se sometió al método 1 de HPLC para su análisis aquiral. La conversión se estimó mediante el área de HPLC relativa. El filtrado restante se concentró parcialmente con un vapor de nitrógeno y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó y el resto se disolvió en isopropanol-heptano (1:1), se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m y se sometió al método 4 de HPLC para su análisis quiral.

El efecto de los codisolventes (5-10 % de volumen) se evaluó para la hidrólisis catalizada por Pen V amidasa de ($\pm$)-(2). Alcanos de cadena lineal tales como hexano, heptano, octano y tetradecano mejoraron la enantioselectividad con un ligero efecto sobre la actividad enzimática. Se muestran datos representativos en la Tabla 2:

Tabla 2. Efecto de codisolventes ^a miscibles en agua

Codisolvente	Conversión (%)	ee (%)
Ninguno	45	93,2
Hexano	25	98,0
Heptano	52 ^b	97,4
Octano	32	96,9
Tetradecano	39	96,0

a. SM ($\pm$)-(2) 20 g/l, Pen V amidasa 50 g/l, codisolvente 10 %, pH 7, temperatura ambiente, 24 h.

b. La conversión podría sobreestimarse.

Se llevaron a cabo múltiples experimentos con distintas concentraciones de heptano con distinto pH y temperaturas para evaluar el efecto de la hidrólisis catalizada por Pen V amidasa del éster de dimetilo ($\pm$)-(2). Considerando tanto la actividad enzimática como la enantioselectividad, las mejores condiciones se determinaron que eran: tampón acuoso, pH de 6,5 a 7 con aproximadamente un 20 % de volumen de heptano a 28-32 °C.

Hidrólisis enzimática del éster de dimetilo ($\pm$)-(2) para preparar *cis*-(1*S*,2*S*)-(6a)

La reacción se llevó a cabo en un matraz de 500 ml revestido sobre un STAT de pH para mantener la temperatura a 32 °C y pH 7,0 mediante adición automática de 1 M de NaOH acuoso. Al matraz se cargaron 30 g de Pen V amidasa, 240 ml de 0,1 M de tampón de fosfato pH 7,0 y 60 ml de heptano. Con agitación, se añadió el éster de dimetilo ($\pm$)-(2) (6,47 g). Después de 22 h, el análisis de una muestra mostró una conversión del 48 %. El consumo de NaOH también indicó la finalización de la reacción. La mezcla de reacción completa se ajustó a un pH 8,0 con 1 M de NaOH y se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con 0,1 M de tampón de fosfato, pH 8,0 (200 ml) y agua (200 ml). La retirada de disolvente proporcionó 3,1 g del éster de dimetilo restante (2*R*)-(2b), rendimiento aislados del 48 %, AP 98, $[\alpha]_D^{25} + 34,15$ (c 1,95, CHCl₃). RMN (CDCl₃) ¹H δ 5,38-5,49 (m, 1H), 5,30 (dd, *J* = 17,0, 1,8 Hz, 1H), 5,15 (dd, *J* = 10,0, 1,8 Hz, 1H), 3,75 (s, 6H), 2,60 (m, 1H), 1,73 (dd, *J* = 7,5; 4,9 Hz, 1H), 1,59 (dd, *J* = 9,0, 4,9 Hz, 1H) ppm. ¹³C δ 169,59, 167,37, 132,74, 118,29, 52,33 (2C), 35,42, 31,04, 20,20 ppm.

La fase acuosa (pH 8,0) se acidificó a pH 2 con 6 N de HCl inmediatamente después de la extracción del diéster sin reaccionar restante. La extracción de la fase acuosa acidificada con acetato de etilo (3 x 200 ml) de retirada con disolvente proporcionó el monoácido de *cis*-(1*S*,2*S*)-(6a) deseado, 2,5 g, rendimiento aislado del 42 %, AP 97, de del 99 % y ee del 95 %, $[\alpha]_D^{25} - 8,28$ (c 1,63, CHCl₃). RMN (CDCl₃) ¹H δ 10,5 (amplio, 1H), 5,6 (m, 1H), 5,39 (d, *J* = 17,1 Hz, 1H), 5,24 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,73 (m, 1H), 2,0 (m, 2H) ppm. RMN ¹³C δ 171,99, 170,29, 131,99, 119,56, 52,49, 35,53, 33,86, 21,86 ppm.

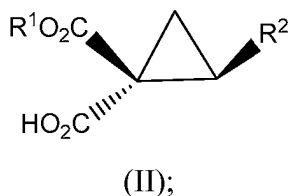
Hidrólisis no enzimática para determinar el ee de (2*R*)-(2b)

Se enfrió una solución de (2*R*)-(2b) (840 mg, 4,6 mmol) obtenida a partir del experimento de hidrólisis enzimática descrito anteriormente en 5 ml de MeOH en un baño de hielo. Con agitación, se añadieron 330 mg de KOH (5,9 mmol) en tres partes en 10 min. Después de 5 h, la mezcla de reacción se concentró, se mezcló con 10 ml de agua, se extrajo con acetato de etilo (3x10 ml). La fase acuosa se acidificó a pH 4,5 con 1 M de HCl y se extrajo con acetato de etilo (2x10). La retirada con disolvente del extracto orgánico ácido proporcionó 272 mg de la mezcla

de monoácido. El AP total de 98 y de del 85 % se determinaron mediante el método 1 de HPLC quirál. El ee de *cis*-(1*R*,2*R*)-(6**b**) obtenido se determinó que era del 82 % mediante el método 4 de HPLC quirál.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (II)



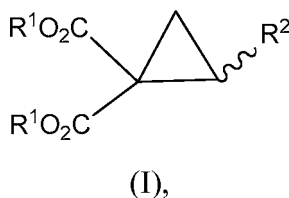
en donde

R¹ es alquilo; y

R² se selecciona entre alquenilo y alquilo;

comprendiendo el proceso:

hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I)



con la enzima de Penicillina V amidohidrolasa de *Fusarium oxysporum*.

2. El proceso de la reivindicación 1 en donde la Penicilina V amidohidrolasa de la enzima de *Fusarium oxysporum* se obtiene a partir de un organismo recombinante que contiene el gen de la Penicilina V amidohidrolasa de *Fusarium oxysporum*.

3. El proceso de la reivindicación 1 en donde R¹ es alquilo, en donde el alquilo se selecciona entre metilo, etilo, propilo y butilo.

4. El proceso de la reivindicación 1 donde R² es alquenilo C₂.

5. El proceso de la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso diastereomérico igual a o superior al 90 %.

6. El proceso de la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso diastereomérico del 95 % o superior.

7. El proceso de la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso enantiomérico de más del 70 %.

8. El proceso de la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso enantiomérico del 90 % y superior.

9. El proceso de la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (II) se obtiene con un exceso enantiomérico del 95 % y superior.