

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 801**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04	(2006.01)
C12N 11/00	(2006.01)
C12N 11/08	(2006.01)
C12N 11/14	(2006.01)
C12P 7/02	(2006.01)
C12P 7/22	(2006.01)
C07D 487/04	(2006.01)
C07D 207/08	(2006.01)
C07D 207/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/US2014/023858**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14150639**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14768236 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2968269**

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

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791247 P

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

06.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**XU, FENG;
LIU, ZHUQING;
DESMOND, RICHARD;
PARK, JEONGHAN;
KALININ, ALEXEI;
KOSJEK, BIRGIT;
STROTMAN, HALLENA;
LI, HONGMEI y
MONCECCHI, JOHANNAH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 746 801 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 de preparación de agonistas beta-3 y productos intermedios

CAMPO TÉCNICO

5 La presente divulgación se refiere a un proceso de preparación de agonistas beta-3 y productos intermedios usando enzimas biocatalizadoras cetorreductasa (KRED) y a métodos de uso de los biocatalizadores.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS, TABLA O PROGRAMA INFORMÁTICO

10 La copia oficial del Listado de secuencias se presenta simultáneamente con la memoria descriptiva como un archivo de texto con formato ASCII mediante EFS-Web, con el nombre de archivo "23146-SeqList.txt", una fecha de creación de 7 de marzo de 2014 y un tamaño de 2,68 kb. El Listado de secuencias presentado mediante EFS-Web es parte de la memoria descriptiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La solicitud se refiere a procesos eficientes y económicos, como se describen en más detalle a continuación, para la preparación de los agonistas de beta-3 de la fórmula I-7 y compuestos intermedios que se pueden usar para la preparación de estos agonistas.

15 El documento de patente US 2011/028481 se refiere a hidroximetilpirolidinas como agonistas de receptores β 3-adrenérgicos (β 3AR), composiciones farmacéuticas que los contienen, así como a métodos para el tratamiento o la profilaxis de trastornos mediados por β 3AR usando dichos compuestos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La FIGURA 1 (FIG. 1) es un patrón de difracción de rayos X de polvo de la sal cristalina, forma del compuesto I-5(b) del Ejemplo 1.

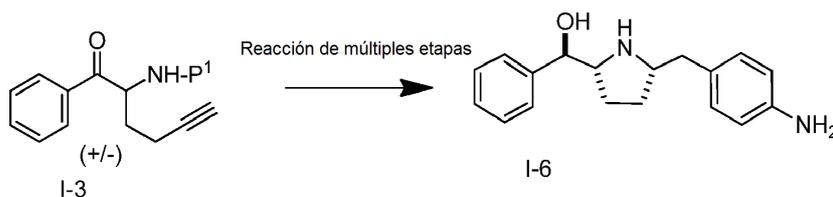
La FIGURA 2 (FIG. 2) es un patrón de difracción de rayos X de polvo de la forma anhidra de base libre I del compuesto I-7 del Ejemplo 1.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La presente solicitud se refiere a un proceso de síntesis de múltiples etapas para la preparación de un compuesto de fórmula I-7 y sus productos intermedios. Se usa una enzima KRED en el proceso de múltiples etapas.

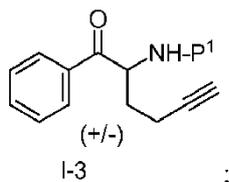
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En el presente documento se describe un proceso de preparación del compuesto I-6, un producto intermedio clave para la preparación de agonistas beta-3, a partir del compuesto I-3.

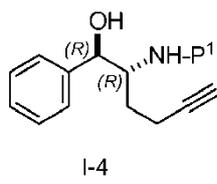


30 En la primera realización, las reacciones de múltiples etapas del compuesto I-3 al compuesto I-6 comprenden las siguientes etapas:

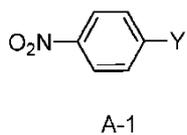
(a-2) reducir el compuesto I-3:



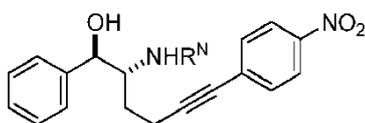
en presencia de una enzima KRED para producir el compuesto I-4:



(b-2) acoplar el compuesto I-4 con el compuesto A-1 en presencia del catalizador D para producir el compuesto I-5(a)

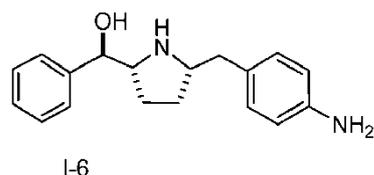
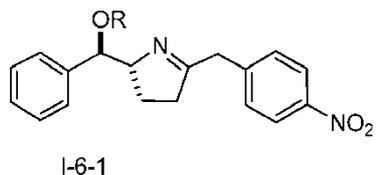


5 seguido por desprotección *in situ* con un ácido para producir el compuesto I-5(b) como una sal:



I-5(a), donde $R^N = P^1$ o I-5 (b) donde, $R^N = H$;

(c-2) ciclar y reducir el compuesto I-5(b) en presencia del catalizador E para producir el compuesto I-6 mediante I-6-1:



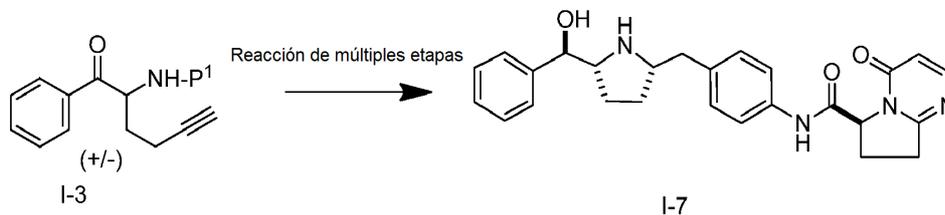
10 en donde P^1 se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts; y

Y se selecciona de Cl, I, Br y OTf; y

R se selecciona del grupo que consiste en H, TMS, TES, TBDMS, TIPS y TBDPS;

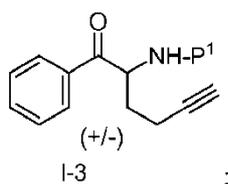
15 y R^N es P^1 o H.

Por tanto, se describe en el presente documento un proceso de preparación del compuesto I-7 a partir del compuesto I-3 mediante reacciones de múltiples etapas:

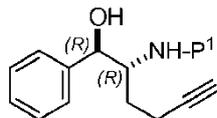


20 En la segunda realización, las reacciones de múltiples etapas desde el compuesto I-3 hasta el compuesto I-7 comprenden las siguientes etapas:

(a-2) reducir el compuesto I-3:

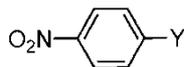


en presencia de una enzima KRED para producir el compuesto I-4:



I-4 ;

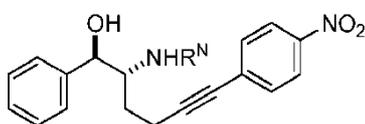
(b-2) acoplar el compuesto I-4 con el compuesto A-1 en presencia del catalizador D para producir el compuesto I-5(a)



A-1 ,

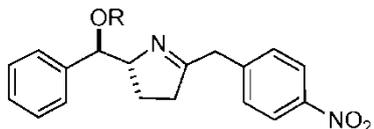
5

seguido por desprotección *in situ* con un ácido para producir el compuesto I-5(b) como una sal:

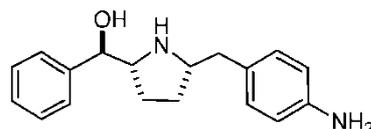


I-5(a), donde $R^N = P^1$ o I-5 (b) donde, $R^N = H$

(c-2) ciclar y reducir el compuesto I-5(b) en presencia del catalizador E para producir el compuesto I-6 mediante I-6-1:



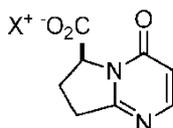
I-6-1



I-6 ;

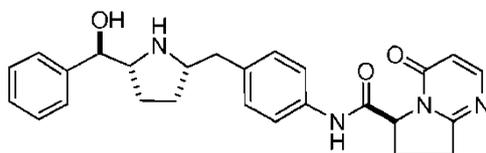
10

(d-2) acoplar el compuesto I-6 con el compuesto A-2:



A-2

en presencia de un agente de acoplamiento y opcionalmente que incluye una base para producir el compuesto I-7;



I-7

15

en donde P^1 se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts; y

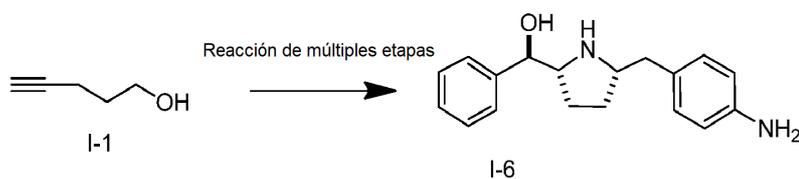
X se selecciona de Na, Li y K;

20 Y se selecciona de Cl, I, Br y OTf; y

R se selecciona del grupo que consiste en H, TMS, TES, TBDMS, TIPS y TBDPS;

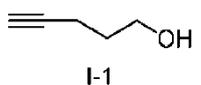
y R^N es P^1 o H.

También se describe en el presente documento un proceso de preparación del compuesto I-6, un producto intermedio clave para la preparación de agonistas beta-3, a partir del compuesto I-1.

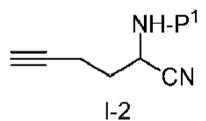


5 En la tercera realización, las reacciones de múltiples etapas desde el compuesto I-1 hasta el compuesto I-6 comprenden las siguientes etapas:

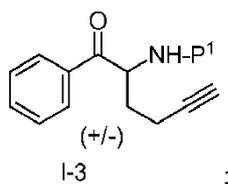
(a-1) hacer reaccionar el compuesto I-1:



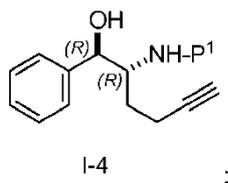
10 en presencia de un disolvente, un agente de oxidación y el catalizador A para formar un aldehído *in situ*, seguido por una condensación en presencia de X-CN y sal de amonio y un reactivo protector, P¹₂O o P¹Cl, para producir el compuesto I-2:



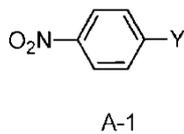
(b-1) hacer reaccionar el compuesto I-2 en presencia de reactivo de Grignard de fenilo para producir el compuesto I-3:



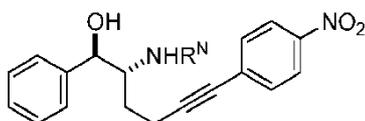
15 (c-1) reducir el compuesto I-3 en presencia de una enzima KRED para producir el compuesto I-4:



(d-1) acoplar el compuesto I-4 con el compuesto A-1 en presencia del catalizador D para producir el compuesto I-5(a)

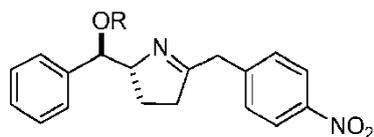


20 seguido por desprotección *in situ* con un ácido para producir el compuesto I-5(b) como una sal:

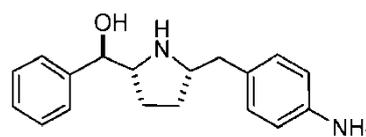


I-5(a), donde R^N=P¹ o I-5 (b) donde, R^N=H

(e-1) ciclar y reducir el compuesto I-5(b) en presencia del catalizador E para producir el compuesto I-6 mediante I-6-1:



I-6-1



I-6

en donde P¹ se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, Fmoc, Ns, Moz y Ts; y

X se selecciona de Na, Li y K;

5 Y se selecciona de Cl, I, Br y OTf; y

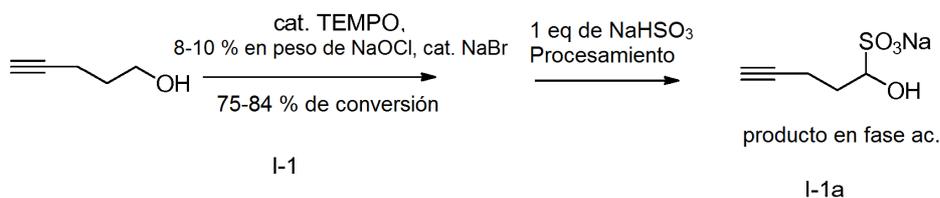
R se selecciona del grupo que consiste en H, TMS, TES, TBDMS, TIPS y TBDPS;

y R^N es P¹ o H.

10 En una realización, el disolvente en la etapa (a-1), como se exponen en la primera realización anterior, se selecciona del grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, EtOAc, *i*-PrOAc, Me-THF, hexano, heptano, DMAc, DMF, metil ciclopentil éter, tolueno y una mezcla que comprende dos o más de los disolventes anteriores. En una realización preferida, el disolvente usado en la etapa (a-1) es MeCN. En otra realización, el agente de oxidación se selecciona del grupo que consiste en NaOCl, NaClO₂, PhI(OAc)₂, peróxido de hidrógeno, piridina-trióxido de azufre/Et₃N/DMSO y diversas variantes de Moffatt (véase Ketones: Dialkyl Ketones. Parkes, Kevin E.B. and Richardson, Stewart K. en Comprehensive Organic Functional Group Transformations, volumen 3, 1995, páginas 111-204, Editor(es): Katrizky, Alan R.; Meth-Cohn, Otto; Rees, Charles Wayne, Elsevier, Oxford, UK), PCC, DCC, oxidación de Swern (cloruro oxálico-DMSO-trialquilamina; véase Ketones: Dialkyl Ketones. Parkes, Kevin E.B. and Richardson, Stewart K. en Comprehensive Organic Functional Group Transformations, volumen 3, 1995, páginas 111-204, Editor(es): Katrizky, Alan R.; Meth-Cohn, Otto; Rees, Charles Wayne, Elsevier, Oxford, UK) o sus variantes, TPAP/NMO.

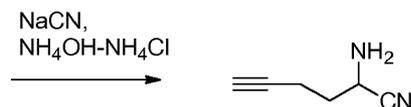
20 En otra realización, la oxidación de la etapa (a-1), como se expone en la primera realización anterior, se lleva a cabo usando el catalizador A que es TEMPO y sus variantes que incluyen, pero no se limitan a, TEMPO/blanqueador/NaBr, TEMPO/ácido tricloroisocianúrico, TEMPO/NCS/TBACl, TEMPO/NCS. En otra realización, el catalizador A es TEMPO o un análogo de TEMPO en presencia o ausencia de una sal de bromuro. En otra realización, la combinación de oxidación de TEMPO preferida es TEMPO/blanqueador-sal de bromuro y TEMPO-PhI(OAc)₂. En una realización adicional se usa una combinación de TEMPO-PhI(OAc)₂ con aditivos adicionales tales como HOAc y agua. En otra realización, el grupo protector es Boc. En una realización adicional, la protección de Boc con (BOC)₂O se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 °C usando EtOAc o *i*-PrOAc.

Alternativamente, el compuesto I-2 se puede preparar mediante aducto de hidrogenosulfito.



I-1

I-1a



I-2a

30 En una realización, la reacción en la etapa (b-1), como se expone en la primera realización anterior, se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 40 °C. En otra realización, la reacción en la etapa (b-1), como se expone en la primera realización anterior, se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente 5 °C.

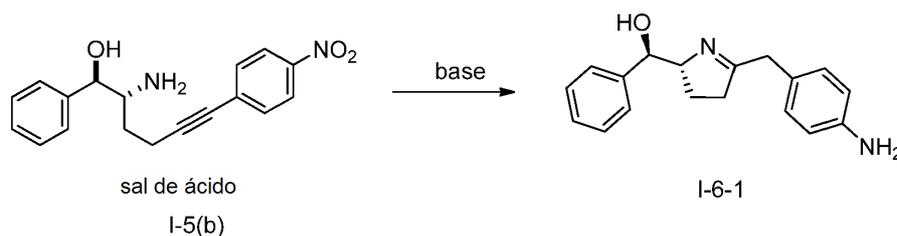
35 En otra realización, la reacción en la etapa (b-1), como se expone en la primera realización anterior, se lleva a cabo en presencia de un disolvente seleccionado del grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, Me-THF, hexano, heptano, metil ciclopentil éter, tolueno y una mezcla que comprende dos o más de los disolventes anteriores.

En otra realización, el reactivo de Grignard en la etapa (b-1), como se expone en la primera realización anterior, es PhMgBr o PhMgCl.

En una realización, la reducción cinética dinámica en presencia de la enzima KRED en la etapa (c-1 o a2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 1 o un fragmento activo de la misma. En otra realización, la reacción en la etapa (c-1 o a-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en un intervalo de pH superior a aproximadamente pH 8 y superior. En una realización adicional, la reacción en la etapa (c-1 o a-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 10 ± 0.5 . En otra realización, la reacción de la etapa (c-1 o a-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. En una realización adicional, la reacción de la etapa (c-1 o a-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 43 °C a aproximadamente 47 °C.

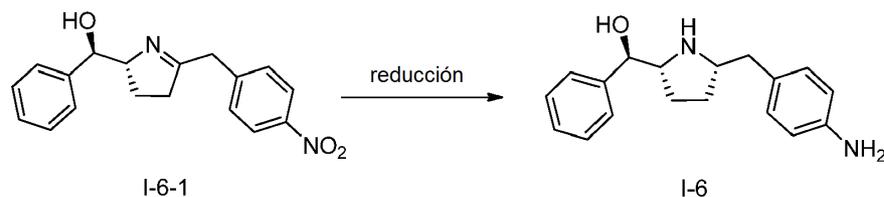
La reacción de acoplamiento de Sonogoshira llevada a cabo en la etapa (d-1 o b-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, es el acoplamiento de un alquino terminal con un haluro de arilo o vinilo y se realiza con un catalizador de paladio, un cocatalizador de cobre (I), o una base de amina (véase Sonogoshira, K. en Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis; Negishi, E., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 2002; pp 493-529). En una realización, el catalizador D usado en la reacción de Sonogoshira en la etapa (d-1 o b-2) se selecciona del grupo que consiste en Pd(PPh₃)₄, PdCl₂, (PPh₃)₂PdCl₂, Pd(dppe)Cl, Pd(dppp)Cl₂, Pd(dppf)Cl₂ y Pd(OAc)₂/Ph₃P u otros ligandos, en presencia o ausencia de cantidad catalítica de material seleccionado de CuI, CuBr y CuCl. En una realización adicional, la combinación de catalizadores es (PPh₃)₂PdCl₂ y CuI. En otra realización, la reacción en la etapa (d-1 o b-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en presencia de un disolvente seleccionado de THF, IPA, MeOH, EtOH, n-PrOH, NMP, DMF, DMAc, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, Me-THF, metil ciclopentil éter y tolueno, y una mezcla que comprende dos o más de los disolventes anteriores. En otra realización, la reacción en la etapa (d-1 o b-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en presencia de un disolvente constituido de una mezcla de THF e IPA. En una realización, el ácido usado en la reacción en la etapa (d-1 o b-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, para la retirada del grupo protector de carbamato se selecciona de HCl, HBr, TFA, MeSO₃H, H₂SO₄, ácido p-toluenosulfónico, ácido fenilsulfónico, ácido canforsulfónico, ácido bromocanforsulfónico, y otros ácidos sulfónicos tales como RSO₃H, en donde R es alquilo C₁₋₆, arilo o arilo sustituido. En otra realización, el ácido usado en la reacción en la etapa (d-1 o b-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, es HCl. En una realización adicional, el producto de reacción en la etapa (d-1 o b-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se aísla como una sal sólida de HCl.

En una realización, la sal de ácido del compuesto I-5(b) reacciona en la etapa (e-1 o c-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, con una base seleccionada de, pero no se limita a, Et₃N, i-Pr₂NEt, i-Pr₂NH, piridina, lutidina, N-metilmorfina, t-BuOK, t-BuONa, t-BuOLi, NaH, NaHMDS, LiHMDS y KHMDS para producir el compuesto I-6-1 mediante una reacción de ciclación intramolecular:



En una realización, la base es Et₃N, i-Pr₂NEt, o i-Pr₂NH. En otra realización, la base es i-Pr₂NEt.

En una realización, el compuesto I-6-1 se reduce al compuesto I-6 en presencia de un catalizador:



Las condiciones de reacción para la conversión de I-6-1 en I-6 se pueden controlar usando un proceso de hidrogenación selectiva para cis. En una realización, la hidrogenación selectiva para cis de la etapa (e-1 o c-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en presencia del catalizador E seleccionado del grupo que consiste en Pt sobre alúmina, Pd sobre alúmina, Rh sobre alúmina, Pd/C, Pd(OH)₂-C, Pt

sobre alúmina-V sobre carbono o vanadato, Ni Raney, Rh/C, Rh/Al, Pt/C, Ru/C y PtO₂. En otra realización, el catalizador E es Pt sobre alúmina.

5 En otra realización, la hidrogenación selectiva para cis de I-6-1 a I-6 en la etapa (e-1 o c-2) se lleva a cabo en presencia de un reactivo protector de hidroxilo, que protege el grupo hidroxilo *in situ* y, por tanto, mejora la diastereoselectividad. Los reactivos protectores se pueden seleccionar de TMSCl, HMDS, TESCl, TIPSCl y TBDMSCl. En otra realización, el reactivo protector es TMSCl.

10 En una realización, la reacción de hidrogenación de la etapa (e-1 o c-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo a aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C. En otra realización, la reacción de hidrogenación de la etapa (e-1 o c-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 50 °C. En una realización adicional, la reacción de hidrogenación de la etapa (e-1 o c-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo escalonadamente a aproximadamente 20 °C y luego a aproximadamente 50 °C.

15 En otra realización, la reacción de reducción de la etapa (e-1 o c-2), como se expone en la primera, segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en presencia de gas hidrógeno. En otra realización, la presión del gas hidrógeno varía desde aproximadamente 1,03 hasta aproximadamente 27,60 bares (aproximadamente 15 a aproximadamente 400 psi). En una realización adicional, la presión del gas hidrógeno varía desde aproximadamente 3,45 hasta aproximadamente 6,90 bares (aproximadamente 50 a aproximadamente 100 psi).

20 La reacción entre I-6 y A-2 se puede llevar a cabo en presencia de un reactivo de acoplamiento. Los reactivos de acoplamiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, CDI, DCC, EDC, metyoduro de EDC, T3P, HATU, HBTU y anhídridos mixtos. En otra realización, el agente de acoplamiento es DCC, EDC, o metyoduro de EDC. En una realización adicional, el reactivo de acoplamiento es EDC.

25 La reacción entre I-6 y A-2 se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente mientras que el sustrato se trata con un ácido tal como HCl, MeSO₃H, H₂SO₄ para proteger selectivamente la amina secundaria de pirrolidina. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, disolventes tanto acuosos como no acuosos tales como MeOH, EtOH, alcohol isopropílico (IPA), n-PrOH, MeCN, DMF, DMAc, NMP, THF, EtOAc, IPAc, o tolueno.

Se puede usar un promotor en la reacción entre I-6 y A-2. Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, HOBT y HOPO.

30 Los valores de pH adecuados para la reacción entre I-6 y A-2 pueden ser aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5,0, o más específicamente, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, o incluso más específicamente, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5. El pH se puede ajustar a los intervalos deseados usando un ácido tal como HCl, HBr, HI, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄, TFA y MeSO₃H. En una realización, el pH es aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,7. En otra realización, el pH es aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,5.

35 En una realización, la reacción en la etapa (d-2), como se expone en la segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en presencia de una base. En una realización adicional, la reacción en la etapa (d-2), como se expone en la segunda o tercera realizaciones anteriores, se lleva a cabo en presencia de piridina o sal de piridina. La sal de piridina incluye, pero no se limita a, la sal de HCl correspondiente, sal de H₂SO₄, sal de H₃PO₄, sal de HBr, sal de HI, sal de HNO₃ o sal de MeSO₃H.

40 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, la enzima KRED comprende una secuencia de polipéptidos expuesta en SEQ ID NO. 1 o un fragmento activo de la misma.

En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, también está presente un sistema de reciclaje de cofactores, además de una enzima KRED. Los sistemas de reciclaje de cofactores adecuados incluyen, pero no se limitan a, una enzima KRED tal como el polipéptido de SEQ ID NO. 1 y una enzima glucosa deshidrogenasa.

45 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, una enzima KRED que comprende una secuencia de polipéptidos expuesta en SEQ ID NO. 1 o un fragmento activo de la misma y un sistema de reciclaje de cofactores están presentes en la reducción de I-3 a I-4.

50 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, también está presente una molécula de cofactor que puede donar un hidruro, además de una enzima KRED. En una realización, el cofactor se selecciona del grupo que consiste en NADH y NADPH.

En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, también está presente una molécula de co-sustrato que puede proporcionar un hidruro para la reciclaje de una molécula de cofactor, además de una enzima KRED. En una realización, el co-sustrato se selecciona del grupo de alcoholes secundarios que incluyen, pero no se limitan a, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol y 2-octanol.

En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, la reducción enzimática de I-3 a I-4 se lleva a cabo en un disolvente. Los disolventes adecuados se pueden seleccionar del grupo que consiste en 2-propanol, sec-butanol, iso-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol, DMSO, DMF, DMAc y NMP, y combinaciones de los mismos. En una realización, el disolvente es 2-propanol.

5 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, una temperatura adecuada para la reducción por resolución cinética dinámica (RCD) de I-3 a I-4 varía desde aproximadamente 0 °C hasta aproximadamente 60 °C, o más específicamente desde aproximadamente 30 °C hasta aproximadamente 50 °C, o incluso más específicamente desde aproximadamente 43 °C hasta aproximadamente 47 °C. En una realización, la temperatura es aproximadamente 45 °C.

10 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, una enzima KRED se acopla con un sistema de reciclaje de cofactores y se usa un cofactor de NADPH para reducir el compuesto I-3 para obtener el compuesto I-4. Las condiciones de reacción adecuadas para la reducción catalizada por KRED de I-3 a I-4 se proporcionan más adelante y en los ejemplos.

15 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, la enzima KRED o fragmento activo de la misma se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, la enzima KRED o fragmento activo de la misma que tiene actividad de cetorreductasa de la presente divulgación se puede inmovilizar sobre un soporte sólido tal que retenga su actividad mejorada, estereoselectividad, y/u otras propiedades mejoradas con respecto al polipéptido de referencia de SEQ ID NO: 1 o fragmento activo de la misma. En dichas realizaciones, los polipéptidos inmovilizados pueden facilitar la conversión biocatalítica del sustrato del compuesto I-3 o análogos estructural del mismo en el producto del compuesto I-4 o análogos estructurales correspondientes (por ejemplo, como se muestra en el proceso del Esquema 1 descrito en el presente documento), y después de que se complete la reacción se retiene fácilmente (por ejemplo, por perlas de retención sobre las que se inmoviliza el polipéptido) y luego se reutiliza o recicla en reacciones posteriores. Dichos procesos enzimáticos inmovilizados permiten eficiencia y reducción de costes adicionales. Por consiguiente, se contempla además que cualquiera de los métodos de uso de la enzima KRED o fragmento activo de la misma de la presente divulgación se puedan llevar a cabo usando la misma enzima KRED o fragmento activo de la misma unida o inmovilizada sobre un soporte sólido.

20 Se conocen bien en la técnica los métodos de inmovilización de enzimas. La enzima KRED se puede unir no covalentemente o covalentemente. Se conocen bien en la técnica diversos métodos de conjugación y inmovilización de enzimas a soportes sólidos (por ejemplo, resinas, membranas, perlas, vidrio, etc.) y se describen en, por ejemplo: 25 Yí et al., "Covalent immobilization of ω -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 on chitosan beads", *Process Biochemistry* 42(5): 895-898 (Mayo de 2007); Martin et al., "Characterization of free and immobilized (S)-aminotransferase for acetophenone production", *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(4): 843-851 (Sept. 2007); Koszelewski et al., "Immobilization of ω -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63: 39-44 (Abril de 2010); Truppo et al., "Development of an Improved Immobilized CAL-B for the Enzymatic Resolution of a Key Intermediate to Odanacatib", *Organic Process Research & Development*, publicado en línea: dx.doi.org/10.1021/op200157c; Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Segunda Edición, Academic Press (2008); Mateo et al., "Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment", *Biotechnology Progress* 18(3):629-34 (2002); y 35 *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*, en *Methods in Molecular Biology*, C.M. Niemeyer ed., Humana Press (2004)

40 Los soportes sólidos útiles para inmovilizar la enzima KRED de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, perlas o resinas que comprenden polimetacrilato con grupos funcionales epóxido, polimetacrilato con grupos funcionales aminoepóxido, copolímero de estireno/DVB o polimetacrilato con grupos funcionales octadecilo. Los soportes sólidos a modo de ejemplo útiles para inmovilizar la enzima KRED de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, perlas de quitosano, Eupergit® C y SEPABEADS® (Mitsubishi Chemical Company), que incluyen los siguiente tipos diferentes de SEPABEAD®: HP2MG; EC-EP, EC-HFA/S; EXA252, EXE119 y EXE120. En algunas realizaciones, el soporte sólido puede ser una perla o resina que comprende carbonato.

45 Las enzimas KRED que pertenecen a la clase de oxidorreductasas son útiles para la síntesis de alcoholes ópticamente activos a partir de los sustratos de cetona pro-estereoisoméricos correspondientes por reducción estereoespecífica de sustratos de aldehído y cetona racémicos correspondientes. Las cetorreductasas aisladas requieren la presencia de un cofactor de nicotinamida. Se transfieren hidrógeno y dos electrones desde el cofactor de nicotinamida reducido (NADH o NADPH) hasta el grupo carbonilo del sustrato para efectuar una reducción al alcohol quiral.

50 En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, el compuesto I-7 se obtiene en forma de una base libre anhidra cristalina. En la primera, segunda o tercera realizaciones enumeradas anteriormente, el compuesto I-7 se obtiene en forma de un hemihidrato de base libre cristalina.

55 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" significa grupos de hidrocarburo alifático saturado tanto ramificado como de cadena lineal que tienen el número de átomos de carbono especificado. Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ incluye, pero no se limita a, metilo (Me), etilo (Et), n-propilo (Pr), n-butilo (Bu), n-pentilo, n-hexilo, y los isómeros de

los mismos tales como isopropilo (i-Pr), isobutilo (i-Bu), sec-butilo (s-Bu), *terc*-butilo (t-Bu), isopentilo, sec-pentilo, *terc*-pentilo e isohexilo.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un carbociclo aromático. Por ejemplo, arilo incluye, pero no se limita a, fenilo y naftalilo.

5 En toda la solicitud, los siguientes términos tienen los significados indicados , a menos que se indique de otro modo:

<u>Término</u>	<u>Significado</u>
Ac	Acilo (CH ₃ C(O)-)
Bn	Bencilo
BOC (Boc)	t-Butiloxicarbonilo
(Boc) ₂ O	Dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
t-BuOK	Terc-butóxido de potasio
t-BuOLi	Terc-butóxido de litio
t-BuONa	Terc-butóxido de sodio
Bz	Benzoílo
Cbz	Carbobenciloxi
CDI	1,1'-Carbonildiimidazol
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
RCD	Resolución cinética dinámica
DMAc	N,N-dimetilacetamida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMPM	3,4-Dimetoxibencilo
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
dr (Dr)	relación de diaestereómeros
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ee	exceso enantiomérico
Et	Etilo
EtOAc	Acetato de etilo
FMOC	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HMDS	Hexametildisilazano
HOBT	1-Hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOPO	N-óxido de 2-hidroxipiridina
Immobead™ 150A	una perla portadora de enzimas apolares de polímero acrílico macroporoso

ES 2 746 801 T3

IPA	Alcohol isopropílico
KHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de potasio
KRED	Cetorreductasa
CL/EM o LC-MASA	Cromatografía de líquidos-espectro de masas
LCAP	Porcentaje de área de cromatografía de líquidos
Me	Metilo
Moz o MeOZ	<i>p</i> -Metoxibencilcarbonilo
MTBE	Metil terc-butil éter
NaHMDS	Hexametildisilazida de sodio
NADP	Sal de sodio de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMP	N-Metil-2-pirrolidona
Ns	4-Nitrobencenosulfonilo
OTf	Triflato
PCC	Clorocromato de piridinio
5 % de Pd/Al ₂ O ₃	Paladio, 5 por ciento en peso sobre óxido de aluminio
5 % de Pd/C	Paladio, 5 por ciento en peso sobre carbono activo
10 % de Pd/C	Paladio, 10 por ciento en peso sobre carbono activo
PdCl ₂	Cloruro de paladio (II)
(PPh ₃) ₂ PdCl ₂	Dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II)
Pd(<u>dppe</u>)Cl	1,2-bis(difenilfosfino)etanocloropaladio
Pd(<u>dppp</u>)Cl ₂	1,3-bis (difenilfosfino)propanodicloropaladio (II)
Pd(<u>dppf</u>)Cl ₂	1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocenodicloropaladio (II)
PhI(OAc) ₂	Diacetato de yodobenceno
PhMgBr	Bromuro de fenilmagnesio
(PPh ₃) ₂ PdCl ₂	Cloruro de trifenilfosfatopaladio
5% de Pt/Al ₂ O ₃	Platino, 5 por ciento en peso sobre óxido de aluminio
Ph	Fenilo
i-PrOAc	Acetato de isopropilo
PrOH	Alcohol propílico
i-Pr ₂ NEt	Diisopropiletilamina (DIPEA)
i-Pr ₂ NH	Diisopropilamina
5 % de Rh/Al ₂ O ₃	Rodio, 5 por ciento en peso sobre óxido de aluminio
T3P	Anhídrido de ácido propanofosfónico
TBACl	Cloruro de tetrabutilamonio
TBDMS	t-Butildimetilsililo
TBDPS	terc-Butildifenilsilil éter

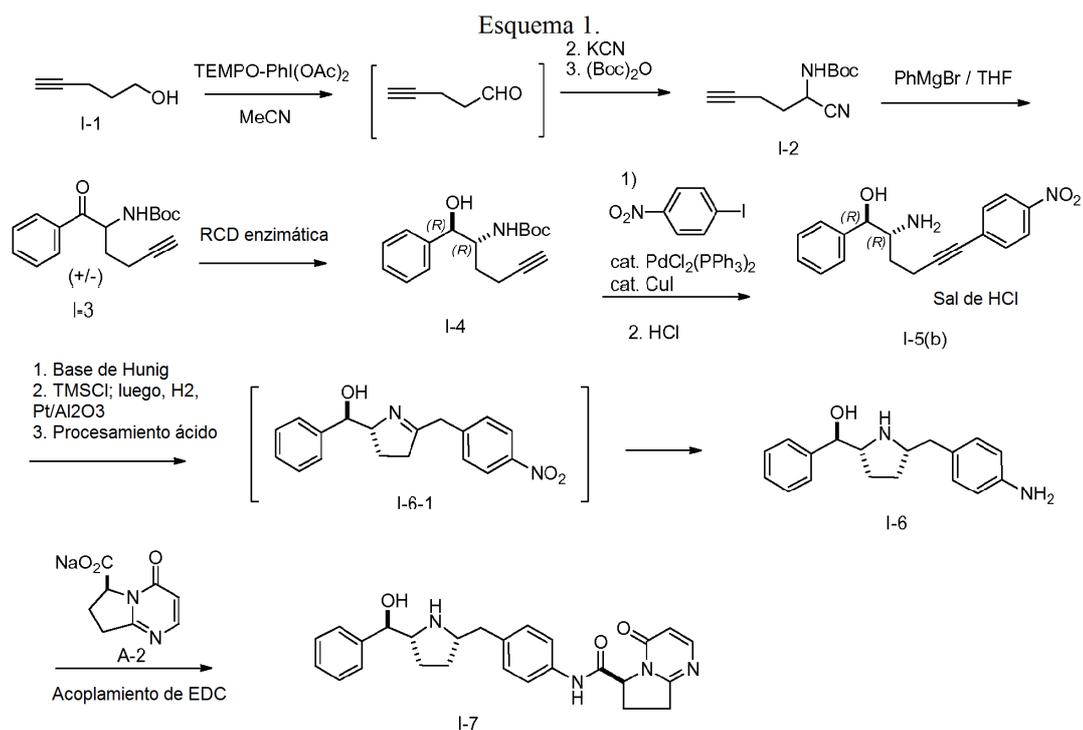
TBDMSCI	Cloruro de terc-butildimetilsililo
TEA o Et ₃ N	Trietilamina
TEMPO	1-Oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
TES	Trietilsililo
TESCI	Trietilclorosilano
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsililo
TIPSCI	Triisopropilclorosilano
TMS	Trimetilsililo
TMSCI	Trimetilclorosilano
TPAP/NMO	Perrutenato de tetrapropilamonio/N-óxido de N-metilmorfolina
Ts	<i>p</i> -Toluenosulfonilo
XRPD	difracción de rayos X de polvo

Los siguientes esquemas de reacción ilustran las etapas de síntesis, reactivos y condiciones empleadas en la síntesis de los compuestos descritos en el presente documento. La síntesis del compuesto I-7, que es el objeto de la presente invención, se puede llevar a cabo por una o más de vías similares.

5 EJEMPLO 1

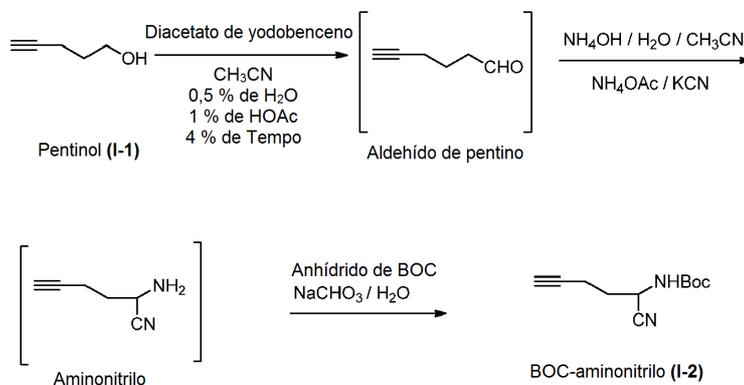
Preparación de los compuestos I-6 y I-7

Se pueden preparar los compuestos I-6 y I-7 a partir del compuesto I-1 como se describe a continuación en el Esquema 1. NOTA: Los compuestos que aparecen entre corchetes [] indican productos intermedios no aislados.



En el Esquema 1, a partir de 4-pentin-1-ol (I-1), se preparó I-2 sin aislar ningún producto intermedio mediante una oxidación de TEMPO-PhI(OAc)₂ seguido por una reacción de Strecker (véase Nitriles: General Methods and Aliphatic Nitriles. North, Michael, en *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*, volumen 3, 1995, páginas 611-640, Editor(es): Katrizky, Alan R.; Meth-Cohn, Otto; Rees, Charles Wayne, Elsevier, Oxford, RU) y protección de Boc *in situ*. Se pudo aislar el compuesto I-2 como un sólido. El tratamiento de I-2 con Grignard de fenilo dio una cetona I-3 racémica, que luego se transformó selectivamente en el alcohol I-4 ópticamente puro en condiciones de reducción de RCD (resolución cinética dinámica) enzimáticas, ya que los dos centros estereogénicos se establecieron en una etapa. Entonces se preparó I-5 mediante una reacción de Sonogashira, seguido por desprotección, y se aisló como una sal de HCl cristalina. El tratamiento de la sal de HCl I-5 con base de Hunig (diisopropiletilamina; véase Ketones: α,β -Unsaturated Ketones. Ebenezer, Warren J. y Wight, Paul, en *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*, volumen 3, 1995, páginas 205-276, Editor(es): Katrizky, Alan R.; Meth-Cohn, Otto; Rees, Charles Wayne, Elsevier, Oxford, RU). En DMAc-THF templado, dio el producto intermedio ciclado I-6-1, que se trató adicionalmente con TMSCl para proteger el OH *in situ*. Como tal, una etapa posterior estereoselectivamente hidrogenada proporcionó el isómero en *cis* deseado con alto rendimiento. Finalmente, el acoplamiento de EDC de I-6 y la sal de sodio del ácido de pirimidinona A-2 completó la preparación de I-7. Las condiciones experimentales detalladas se describen a continuación.

Etapa 1. Preparación del compuesto I-2 a partir del compuesto I-1



Se cargó un matraz redondo de 3 bocas de 250 mL equipado con un agitador superior con 4-pentin-1-ol (I-1) (10 g, 0,119 moles), acetonitrilo (100 mL), agua (0,5 mL), ácido acético (1,0 mL) y TEMPO (0,92 g, 5,8 mmoles). Se cargó diacetato de yodobenceno (39,4 g, 0,124 moles) en porciones durante 2,5 horas, mientras que la temperatura interna se mantuvo a 20-25 °C con un baño de agua fría. Se envejeció la reacción 3,5 horas a temperatura ambiente. La disolución se usó directamente en la posterior reacción de Strecker.

Se cargó un matraz redondo de 3 bocas de 500 mL equipado con un agitador superior con agua (40 mL), hidróxido de amonio (28 % en peso, 40 mL), acetato de amonio (11,45 g, 0,149 moles) y cianuro de potasio (9,68 g, 0,149 moles). Después de agitar para disolver los sólidos, se añadió gota a gota la disolución de aldehído en bruto anterior de la oxidación mientras que la temperatura interna se mantuvo a <40 °C. La reacción se agitó a 45 °C durante 7-10 horas. Se retiró el acetonitrilo a presión reducida mientras que la temperatura interna se mantuvo a <25 °C. Se añadió EtOAc (200 mL). Se separó la fase orgánica.

Etapa 2. Cristalización del compuesto I-2

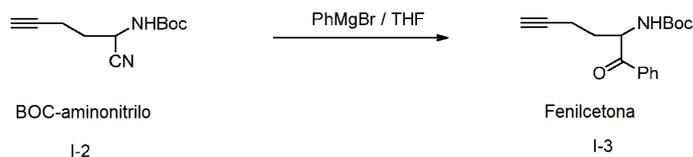
A la disolución orgánica en bruto anterior se cargó (BOC)₂O (26,0 g, 0,119 moles). La mezcla de reacción se calentó gradualmente hasta 35-40 °C y se envejeció a 35-40 °C durante 14 horas adicionales. Se enfrió el lote hasta temperatura ambiente y una disolución acuosa de 7,5 % en peso de NaHCO₃ (50 mL). Se cambió el disolvente de la fase orgánica separada a heptano a volumen final de ~300 mL a vacío, mientras que la temperatura interna se mantuvo a 35-45 °C. Se envejeció la suspensión resultante 2 horas a 20 °C antes de la filtración. La torta húmeda se lavó con heptano (100 mL), y se secó en estufa de vacío a 40 °C dando 18,3 g del compuesto producto I-2. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5,09 (s, a, 1H), 4,74 (s, a, 1H), 2,43 (m, 2 H), 2,08 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 2,04 (m, 2 H), 1,47 (s, 9H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 154,4, 118,5, 81,4, 70,9, 41,8, 32,1, 28,4, 15,1.

Procedimiento de cristalización alternativa para el compuesto I-2

Se concentró la fase orgánica separada hasta ~ 50 mL a vacío, que luego se añadió a una suspensión de heptano (375 mL) sembrada con producto (125 mg) durante varias horas a 15-25 °C. Entonces se cambió el disolvente del lote a heptano a vacío a volumen final de 250 mL, manteniendo la temperatura interna por debajo de 30 °C. Se envejeció la suspensión resultante 2 horas a 20 °C antes de la filtración. La torta húmeda se lavó con heptano (100 mL), y se secó en estufa de vacío a 40 °C dando 18,3 g del producto compuesto I-2.

Etapa 3. Preparación del compuesto I-3 a partir del compuesto I-2



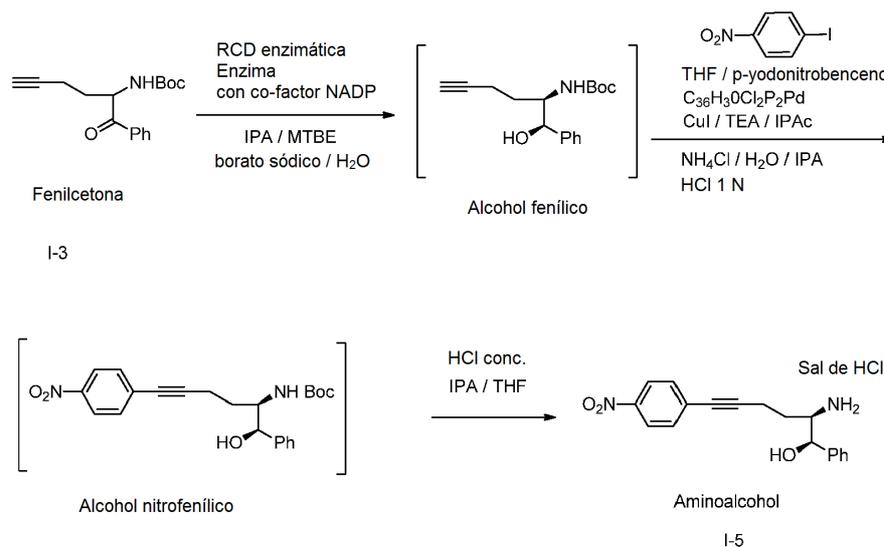
5 A una disolución de PhMgBr (1 molar, "M", en THF, 106 mL, 0,106 moles) a -10 °C se añadió una disolución de Boc-aminonitrilo I-2 (10 g, 0,048 moles) en THF (20 mL) gota a gota durante 2-3 horas. Se envejeció la suspensión de reacción a 0 °C durante 4 horas adicionales. Entonces se añadió la mezcla de reacción a una disolución acuosa de

10 10 % en peso de ácido cítrico (135 mL) a -5 °C a 0 °C durante 0,5 a 1 hora, manteniendo la temperatura interna por debajo de 20 °C. Se agitó la disolución bifásica extinguida a temperatura ambiente durante 1 h y se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con 10 % de salmuera (20 mL). La orgánica se cambió azeotrópicamente de disolvente a isopropanol a un volumen final de ~65 mL. La disolución se calentó hasta 35 °C y se añadió agua (~25 mL). Se sembró el lote. Después de envejecer 30 minutos a 35 °C, se añadió agua (65 mL) gota a gota durante

15 1 hora. Se envejeció la suspensión 30 minutos adicionales a 35 °C, luego, se enfrió hasta temperatura ambiente. El lote se agitó varias horas antes de la filtración. Se lavó la torta húmeda con 30 % de isopropanol en agua (40 mL). El secado en estufa de vacío a 50 °C con barrido de nitrógeno dio el compuesto I-3. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,02 (m, 2 H), 7,61 (m, 1H), 7,50 (m, 2 H), 5,47 (m, 1H), 5,42 (m, 1H), 2,37 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,01 (t, J = 2,3 Hz, 1 H), 1,75 (m, 1 H), 1,46 (s, 9 H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 198,9, 155,8, 134,6, 134,1, 129,1, 129,0, 83,3, 80,2, 69,6, 54,5, 32,9, 28,6, 15,2.

Etapa 4. Preparación del compuesto I-5 a partir del compuesto I-3



20 A una disolución de tetraborato de sodio decahidratado (18,7 g, 4,9 mmoles) en agua (1 L) a temperatura ambiente se añadió NaOH 5 normal ("N") a pH de aproximadamente 10. Se añadió enzima de RCD (2 g) con SEQ ID NO. 1 y se disolvió con agitación suave. Se añadió una disolución de beta-NADP-Na (0,2 g, 0,26 mmoles) en agua (20 mL), seguido por una disolución de fenilcetona I-3 (100 g, 0,348 moles) en *i*-PrOH (1 L) a temperatura ambiente con buena mezcla. Entonces se agitó el lote a 45 °C durante al menos 24 horas. Se enfrió el lote hasta temperatura ambiente y se añadió MTBE (1 L). Se extrajo la fase acuosa separada con MTBE (0,5 L) y *i*-PrOH (0,5 L). Se lavó la fase orgánica combinada con agua (1 L). Entonces se secó azeotrópicamente a vacío la fase orgánica separada a un volumen final de ~0,3 L, manteniendo la temperatura interna por debajo de 45 °C. Se usó directamente la disolución en bruto para la siguiente etapa. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): rotómero principal: δ 7,34 (m, 4 H), 7,28 (m, 1H), 4,75 (s, a, 1H), 4,73 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,27 (s, 1H), 2,27 (m, 2 H), 1,97 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,37 (3, 9H). RMN ¹³C (100 MHz, *d*₆-DMSO): rotómero principal: δ 156,7, 141,9, 128,5, 127,9, 126,5,

25 83,9, 79,9, 76,0, 69,1, 56,2, 30,6, 28,5, 15,7.

30 A la disolución en bruto se añadió THF (0,3 L) seguido por p-yodonitrobenzene (90,4 g, 0,363 moles). Después de desgasificar a vacío con nitrógeno, se añadió dicloruro de bisotrietilfosfina-paladio (II) (2,43 g, 0,35 mmoles) seguido por CuI (1,3 g, 0,68 mmoles) y trietilamina (36,7 g, 0,363 moles). Se agitó el lote a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió *i*-PrOH (1 L). Se lavó el lote con 10 % de NH₄Cl ac. (2 x 0,3 L) dos veces, HCl 1 N (0,3 L) y agua (0,3 L). La fase orgánica separada se cambió azeotrópicamente de disolvente a *i*-PrOH a vacío dando una suspensión a un volumen final de ~0,6 L, manteniendo la temperatura interna por debajo de 45 °C. Se añadió HCl concentrado (37%) y entonces se agitó el lote a 60 °C durante 5 horas. Se enfrió la suspensión hasta temperatura

ambiente y se envejeció durante 3 horas antes de la filtración. La torta húmeda se lavó por desplazamiento con *i*-PrOH (0,2 L) seguido por THF (2 x 0,2 L). Entonces se suspendió la torta húmeda en THF (0,76 L) a 60 °C durante 4 horas. La suspensión se filtró y se lavó por desplazamiento con THF (2 x 0,2 L). El secado en estufa de vacío a 40 °C con barrido de nitrógeno dio el compuesto I-5, sal de HCl. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8,19 (m, 2 H), 7,55 (m, 2 H), 7,47 (m, 2 H), 7,41 (m, 2 H), 7,36 (m, 1H), 4,71 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 2,54 (t, J = 7,2 Hz, 2 H), 1,88 (m, 2 H).

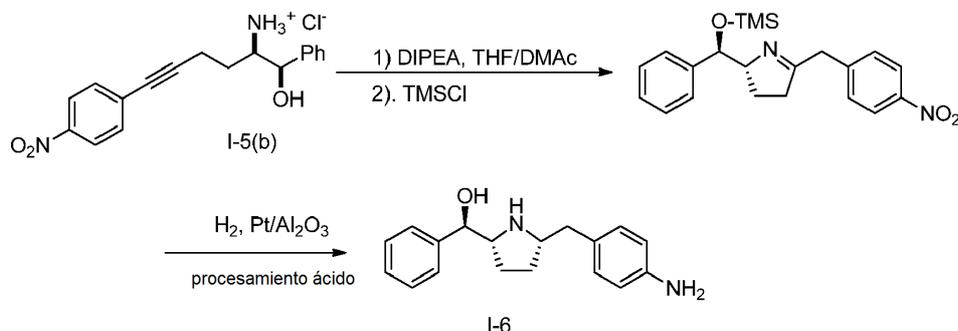
¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 148,6, 142,0, 133,7, 131,6, 130,1, 129,9, 128,2, 124,7, 94,4, 81,5, 74,3, 57,9, 29,7, 16,8.

La forma de sal de HCl cristalina del compuesto I-5(b) se puede caracterizar por XRPD por las siguientes reflexiones con la separación d.

Posición [°2 Theta]	Separación d [Å]
4,2174	20,95196
8,5827	10,3028
12,9282	6,84784
13,5177	6,55051
16,65	5,32461
20,9425	4,24193
22,6974	3,91777
24,363	3,65356
24,6986	3,60468
28,1911	3,16555

10

Etapa 5. Preparación del compuesto I-6 a partir del compuesto I-5(b)



A una suspensión de la sal de HCl del aminoalcohol (I-5(b)) (100 g, 0,288 moles) en THF (500 mL) y DMAc (100 mL) se añadió *i*-Pr₂NEt (151 mL, 0,87 moles) gota a gota bajo nitrógeno, mientras que la temperatura interna se mantuvo por debajo de 25 °C. El lote se agitó a 55-65 °C durante 3-5 horas, luego se enfrió hasta 0-15 °C. Se añadió gota a gota TMSCl (55,3 mL, 0,433 moles) durante 1 hora, mientras que la temperatura interna se mantuvo entre 0 y 15 °C. Después de 0,5 - 1 horas adicionales, se añadió gota a gota MeOH (35 mL, 0,87 moles) durante 0,5 horas y se envejeció el lote durante 0,5 horas adicionales. Entonces se cargó la corriente de reacción a una suspensión de Pt/Al₂O₃ (5 % en peso, 15 g) en THF (500 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hidrógeno a 3,45-6,90 barg (50-500 psig) de H₂ a 20 °C durante 18 horas, seguido por 6 horas adicionales a 50 °C. Entonces, el catalizador se retiró mediante filtración de una almohadilla de SOLKA-FLOC® y se lavó con THF (400 mL). Se añadió gota a gota HCl (0,6 N, ~1,2 L) a pH = 2, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25 °C. Se agitó el lote a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió acetato de isopropilo (300 mL). Se separó la fase acuosa deseada y se añadió acetato de isopropilo (400 mL). Entonces, se añadió gota a gota NaOH 5 N (~30 mL) para ajustar pH = 10. Se separó la fase orgánica y se trató con carbono activo (carbono activo Cuno, 10 g) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró el carbono mediante filtración y el filtrado se cambió de disolvente a IPA a un volumen de ~35 mL. Se calentó el lote hasta 50 °C y se añadió gota a gota agua (30 mL). Entonces, el lote se sembró a 42 °C y se añadió gota a gota agua adicional (50 mL) durante 2 horas. Después de la adición, el lote se

15

20

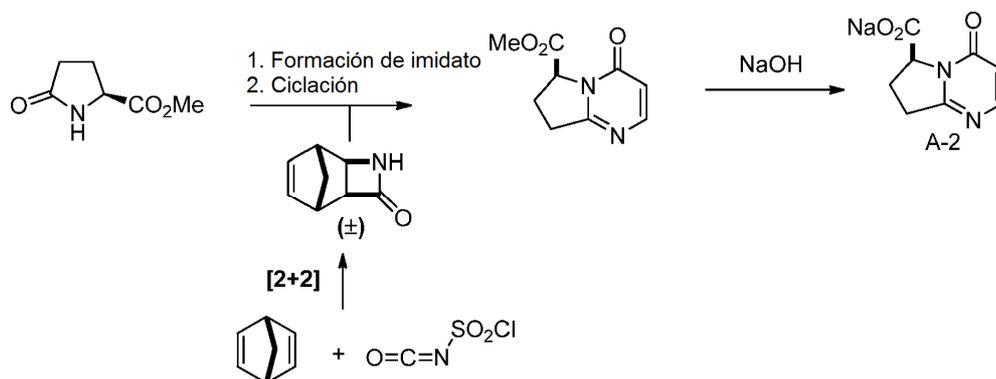
25

enfrío gradualmente hasta 10 °C y se envejeció varias horas adicionales antes de la filtración. Se lavó la torta húmeda con 25 % de IPA en agua (50 mL). El secado por aspiración dio el compuesto I-6 hemihidratado.

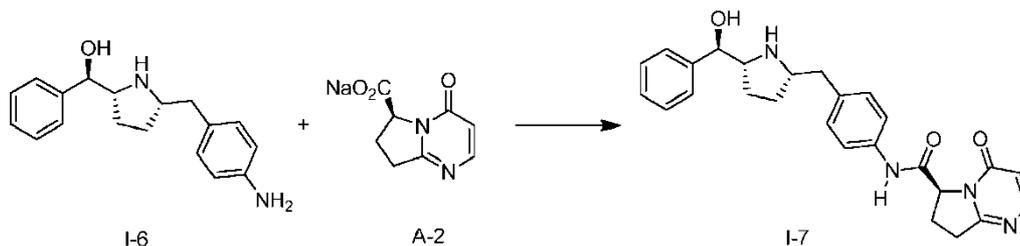
¹H RMN (d₆-DMSO) 8 7,27 (m, 4 H), 7,17 (m, 1H), 6,81 (d, J = 8,1, 2 H), 6,45 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 5,07 (s, a, 1H), 4,75 (s, 2 H), 4,18 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 3,05 (m, 2 H), 2,47 (dd, J = 13,0, 6,7 Hz, 1H), 2,40 (dd, J = 13,0, 6,6 Hz, 1H), 1,53 (m, 1H), 1,34 (m, 1H), 1,22 (m, 2 H).

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

Etapa 6a. Preparación del compuesto A-2



10 Etapa 6. Preparación del compuesto I-7 a partir del compuesto I-6 y compuesto A-2



A un matraz de tres bocas equipado con una entrada de N₂, una sonda de termopar, se cargó pirrolidina hemihidratada I-6 (10,3 g), sal de sodio A-2 (7,87 g), seguido por IPA (40 mL) y agua (24 mL). Entonces se añadió lentamente HCl 5 N (14,9 mL) durante un periodo de 20 minutos para ajustar pH = 3,3-3,5, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 35 °C. Se cargó clorhidrato de EDC sólido (7,47 g) en porciones durante 30 minutos. Se envejeció la mezcla de reacción a TA durante 0,5 - 1 horas adicionales, se añadió gota a gota amoníaco acuoso (14 %) hasta pH ~8,6. Se sembró el lote y se envejeció durante 1 hora adicional para formar un lecho de suspensión. Se añadió gota a gota el resto del amoníaco acuoso (14 %, 53,2 mL totales) durante 6 horas. Se envejeció la suspensión densa resultante 2-3 horas antes de la filtración. Se lavó con desplazamiento la torta húmeda con 30 % de IPA (30 mL), seguido por 15 % de IPA (2 x 20 mL) y agua (2 X 20 mL). La torta se secó por aspiración bajo N₂ durante la noche proporcionando 14,3 g del compuesto I-7.

¹H RMN (DMSO) δ 10,40 (s, NH), 7,92 (d, J = 6,8, 1H), 7,50 (m, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,29 (m, 2H), 7,21 (m, 1H), 7,16 (m, 2H), 6,24 (d, J = 6,8, 1H), 5,13 (dd, J = 9,6, 3,1, 1H), 5,08 (s a, OH), 4,22 (d, J = 7,2, 1H), 3,19 (p, J = 7,0, 1H), 3,16-3,01 (m, 3H), 2,65 (m, 1H), 2,59-2,49 (m, 2H), 2,45 (s a, NH), 2,16 (ddt, J = 13,0, 9,6, 3,1, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,39 (m, 1H), 1,31-1,24 (m, 2H).

¹³C RMN (DMSO) 8 167,52, 165,85, 159,83, 154,56, 144,19, 136,48, 135,66, 129,16, 127,71, 126,78, 126,62, 119,07, 112,00, 76,71, 64,34, 61,05, 59,60, 42,22, 31,26, 30,12, 27,09, 23,82.

La forma anhidra de base libre cristalina I del compuesto I-7 se puede caracterizar por XRPD por las siguientes reflexiones con la separación d.

Posición [°2 Theta]	Separación d [Å]
5,4897	16,09873
8,7494	10,10683

Posición [$^{\circ}2$ Theta]	Separación d [Å]
11,0426	8,01261
16,4521	5,38818
16,6518	5,32402
17,4975	5,06857
18,853	4,7071
21,2176	4,18756
21,7532	4,08564
22,7425	3,9101

EJEMPLO 2Preparación del compuesto I-7 a partir del compuesto I-6

5 A un matraz de tres bocas equipado con una entrada de N₂, una sonda de termopar, se cargó pirrolidina hemihidratada I-6 (10,3 g), sal de sodio A-2 (7,5 g), seguido por IPA (40 mL), piridina (0,42 mL) y agua (21 mL). Entonces se añadió lentamente HCl 5 N (14,9 mL) durante un periodo de 20 minutos para ajustar pH = 3,1-3,7, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25 °C. Se enfrió el lote hasta 5-10 °C. Se cargó clorhidrato de EDC sólido (7,5 g) en porciones durante 30 min hasta 1 hora, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 15 °C. Entonces se envejeció la mezcla de reacción entre 5-10 °C durante 0,5 - 1 horas adicionales. Se añadieron 10 IPA (8 mL) y agua (7 mL) a ta. Se añadió gota a gota amoniaco acuoso (10%, ~3,5 mL) hasta pH ~7,9. Se sembró el 15 lote y se envejeció durante 1 hora adicional para formar un lecho de suspensión. Se añadió gota a gota más amoniaco acuoso (10 %, 32 mL) durante 6-10 horas. Se envejeció la suspensión densa resultante 2-3 h antes de la filtración. Se lavó con desplazamiento la torta húmeda con 30 % de IPA (30 mL), seguido por 15 % de IPA (2 x 20 mL) y agua (2 x 20 mL). La torta se secó por aspiración bajo N₂ durante la noche proporcionando 14,3 g del compuesto I-7.

EJEMPLO 3Inmovilización de la enzima KRED:

20 A una disolución de fosfato de sodio y potasio (6,097 g, 3,5 mmoles) en agua (35 mL) a temperatura ambiente se añadió enzima KRED (875 mg) y NADP (70 mg) y se disolvieron con agitación suave. Se añadió resina polimetacrílica, DIAION™ HP2MG (MITSUBISHI CHEMICALS) (10 g). Se agitó suavemente la mezcla a 25 °C durante al menos 16 horas. Se drenó la resina de toda disolución. La resina húmeda se lavó con una disolución de fosfato de potasio dibásico y posteriormente se drenó. La resina húmeda se almacenó a 4 °C.

Procedimiento de reducción de cetonas:

25 Se añadió enzima KRED inmovilizada (120 mg) a una disolución de cetona (50 mg) disuelta en mezcla de 90 % de IPA – 10 % de agua que contenía carbonato inmovilizado (50 mg). La mezcla se agitó a 25 °C durante al menos 24 horas. Se filtró el lote y se concentró.

EJEMPLO 4Inmovilización de la enzima KRED con resina Immobead™ 150A (IB-150A):

30 A una disolución de fosfato de sodio y potasio 0,1 M a pH 7,0 (20 mL) a temperatura ambiente se añadió enzima KRED con SEQ ID NO. 1 (2 g) y se disolvió con agitación suave. Se cargó resina IB-150A (10 g) (comercialmente disponible de ChiralVision™, Países Bajos) y se envejeció a 25 °C durante 24-48 horas. La resina se separó por filtración de toda disolución, y se lavó tres veces con disolución 0,1 M de fosfato de sodio y potasio a pH 7 y se secó. La resina se almacenó a 4 °C para su uso.

Reducción de cetonas para la preparación de alcohol fenílico por enzima KRED inmovilizada:

35 A un matraz de 1 L se cargaron 360 mL de IPA y 40 mL de agua, seguido por cetona I-3 (21 g, 73,1 mmoles) y 1,4-diazabicyclooctano (41,0 g, 365 mmoles) a 25 °C. La mezcla se agitó hasta que se disolvió todo. Se cargó SEQ ID NO. 1 inmovilizada (10,5 g, 50 % en peso) al matraz y la mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C con agitación suave. Tras el envejecimiento durante aproximadamente 28 horas, la reacción dio normalmente 98 % de

5 conversión, 99 % de ee y Dr 100:1. Se enfrió la reacción hasta 25 °C y se filtró para retirar SEQ ID NO. 1 inmovilizada y se aclaró con 100 mL (5 vol) de IPA. SEQ ID NO. 1 inmovilizada recuperada se puede cargar a disolución nueva de cetona/DABCO IPA/disolución acuosa, y recircular hasta 9 rondas mientras que se alcanzan las especificaciones para conversión y selectividad. Después de retirar la enzima inmovilizada, se secó azeotrópicamente la disolución de reacción en bruto para retirar el agua y reducir el volumen de reacción hasta ~5 volúmenes de IPA. Se añadió ácido fosfórico (5 eq, relación 1:1 con DABCO) a 25 °C y la suspensión posterior se envejeció durante 4 horas. La suspensión se filtró para retirar al menos 96 % de sal de DABCO de la disolución. Se usó directamente disolución en bruto de alcohol fenílico en la etapa posterior.

Listado de secuencias

- 10 <110> MERCK SHARP & DOHME CORP.
 Xu, Feng
 Liu, Zhuqing
 Desmond, Richard
 Park, Jeonghan
- 15 Kalinin, Alexei
 Kosjek, Birgit
 Strotman, Hallena
 Li, Hongmei
 Moncecchi, Johannah
- 20 <120> PROCESO DE PREPARACIÓN DE AGONISTAS BETA-3 Y PRODUCTOS INTERMEDIOS
- <130> 23146
- 25 <150>61/791,247
 <151> 2013-03-15
- <160> 1
- 30 <170>PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 <211> 252
 <212>PRT
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Variante manipulada de cetorreductasa de kéfir de Lactobacillus
- 40 <400> 1

ES 2 746 801 T3

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

Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30

Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45

Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60

Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80

Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val
 85 90 95

Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110

Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Ala Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125

Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140

Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160

Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175

Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190

Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205

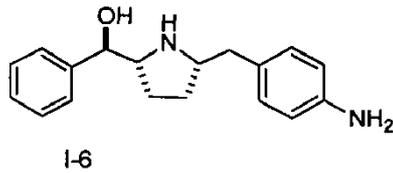
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220

Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Phe Thr Ala Gln
 245 250

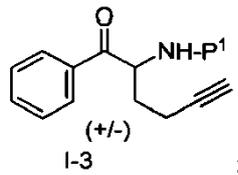
REIVINDICACIONES

1. Un proceso de preparación del compuesto I-6:

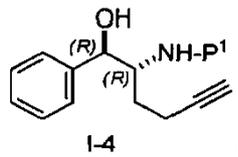


que comprende:

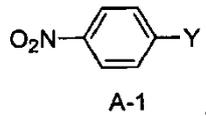
5 (a-2) reducir el compuesto I-3:



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

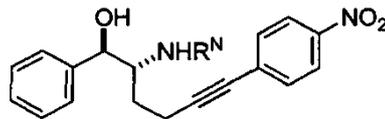


(b-2) acoplar el compuesto I-4 con el compuesto A-1, en presencia del catalizador D para producir I-5(a):



10

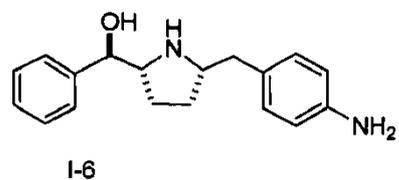
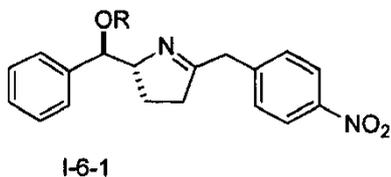
seguido por desprotección *in situ* con un ácido para producir el compuesto I-5(b) como una sal:



I-5(a), donde $R^N = P^1$ o I-5 (b) donde, $R^N = H$;

15

(c-2) ciclar y reducir el compuesto I-5(b) en presencia del catalizador E para producir el compuesto I-6 mediante I-6-1:



en donde P^1 se selecciona del grupo que consiste en Ac, Bn, Boc, Bz, Cbz, DMPM, FMOG, Ns, Moz y Ts; y

Y se selecciona de Cl, I, Br y OTf; y

20

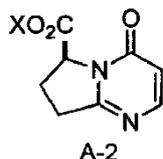
R está limitado al grupo que consiste en H, TMS, TES, TBDMS, TIPS y TBDPS;

y R^N es P^1 o H.

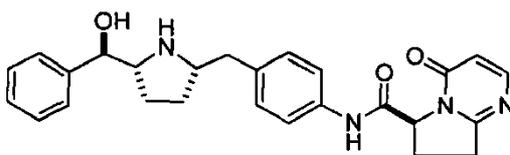
2. Un proceso según la reivindicación 1:

que comprende además

(d-2) acoplar el compuesto I-6 con el compuesto A-2:



5 en presencia de un agente de acoplamiento y opcionalmente que incluye una base para producir el compuesto I-7;



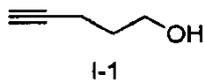
I-7

en donde X se selecciona de Na, Li y K.

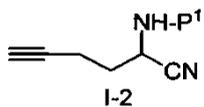
3. Un proceso según la reivindicación 1:

que comprende además:

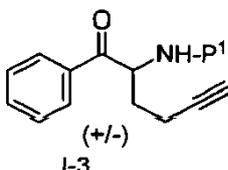
10 (a-1) hacer reaccionar el compuesto I-1:



en presencia de un disolvente, un agente de oxidación y el catalizador A para formar un aldehído *in situ*, seguido por una condensación en presencia de X-CN y cloruro de amonio y un reactivo protector para producir el compuesto I-2:



15 (b-1) hacer reaccionar el compuesto I-2 en presencia de un reactivo de Grignard de fenilo para producir el compuesto I-3:



en donde X se selecciona de Na y K.

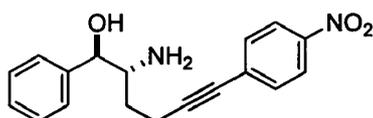
20 4. El proceso de la reivindicación 3, en donde en la etapa (a-1): el disolvente se selecciona del grupo que consiste en THF, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, EtOAc, *i*-PrOAc, Me-THF, hexano, heptano, DMAc, DMF, metil ciclopentil éter, tolueno y combinaciones de los mismos; el agente de oxidación se selecciona del grupo que consiste en NaOCl, NaClO₂, PhI(OAc)₂, peróxido de hidrógeno, piridina-trióxido de azufre/Et₃N/DMSO y una variante de Moffatt, PCC, DCC, una oxidación de Swern o sus variantes, TPAP/NMO; y el catalizador es TEMPO o un análogo de TEMPO.

25 5. El proceso de la reivindicación 3, en donde el grupo protector en la etapa (a-1) es Boc.

6. El proceso de la reivindicación 3, en donde la etapa (a-1) se lleva a cabo a una temperatura de 35 °C a 45 °C en presencia de EtOAc o *i*-PrOAc.

7. El proceso de la reivindicación 3, en donde en la etapa (a-1) el compuesto I-2 se puede preparar mediante un aducto de hidrogenosulfito.

8. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la enzima KRED de reducción cinética dinámica en la etapa (a-2) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 1 o un fragmento activo de la misma.
9. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde un sistema de reciclaje de cofactores está presente en la etapa (a-2).
- 5 10. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la reacción en la etapa (a-2) se lleva a cabo en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en 2-propanol, sec-butanol, iso-butanol, DMSO, DMF, DMAc y NMP, y combinaciones de los mismos.
11. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la reacción en la etapa (a-2) se lleva a cabo en un intervalo de pH de superior a 8.
- 10 12. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la reacción en la etapa (a-2) se lleva a cabo a una temperatura de 30 °C a 50 °C.
13. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde el catalizador usado en la reacción en la etapa (b-2) se selecciona del grupo que consiste en Pd(PPh₃)₄, PdCl₂, (PPh₃)₂PdCl₂, Pd(dppe)Cl, Pd(dppp)Cl₂, Pd(dppf)Cl₂ y Pd(OAc)₂/Ph₃P, en presencia o ausencia de cantidad catalítica de material seleccionado del grupo que consiste en CuI, CuBr o CuCl.
- 15 14. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la reacción en la etapa (b-2) se lleva a cabo en presencia de un disolvente seleccionado del grupo que consiste en THF, IPA, MeOH, EtOH, n-PrOH, NMP, DMF, DMAc, MTBE, CH₂Cl₂, MeCN, Me-THF, metil ciclopentil éter y tolueno, y combinaciones de los mismos.
15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el producto de reacción en la etapa b-2 se aísla como una sal de HCl sólida.
- 20 16. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la sal del compuesto I-5(b) reacciona en la etapa (c-2) con una base seleccionada del grupo que consiste en Et₃N, i-Pr₂NEt, i-Pr₂NH, piridina, lutidina, N-metilmorfina, t-BuOK, t-BuONa, t-BuOLi, NaH, NaHMDS, LiHMDS y KHMDS para producir el compuesto I-6-1 mediante una reacción de ciclación intramolecular.
- 25 17. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto I-6-1 se reduce al compuesto I-6 en la etapa (c-2) en presencia de gas hidrógeno y un catalizador.
18. Una forma de sal de HCl cristalina del compuesto I-5(b), en donde el compuesto I-5(b) tiene la estructura química:



sal de ácido

I-5(b)

- 30 y en donde la forma de sal de HCl cristalina se caracteriza por XRPD por las siguientes reflexiones con la separación d.

Posición [°2 Theta]	Separación d [Å]
4,2174	20,95196
8,5827	10,3028
12,9282	6,84784
13,5177	6,55051
16,65	5,32461
20,9425	4,24193
22,6974	3,91777
24,363	3,65356

ES 2 746 801 T3

Posición [$^{\circ}2$ Theta]	Separación d [Å]
24,6986	3,60468
28,1911	3,16555

Patrón de XRPD de la forma anhidra cristalina del compuesto I-5(b) del Ejemplo 1.

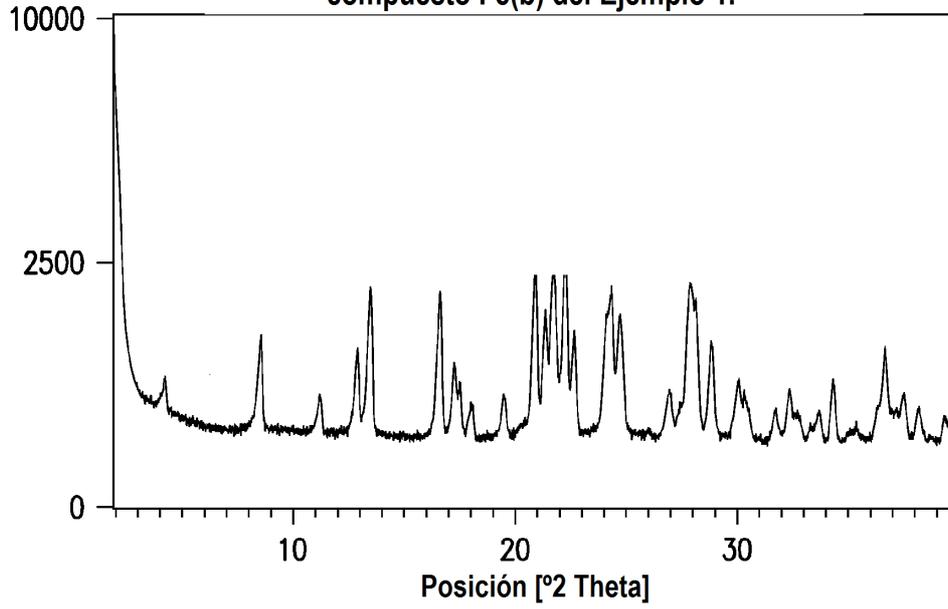


FIG. 1

Patrón de difracción de XRPD de la forma anhidra de base libre I del compuesto I-7 del Ejemplo 1.

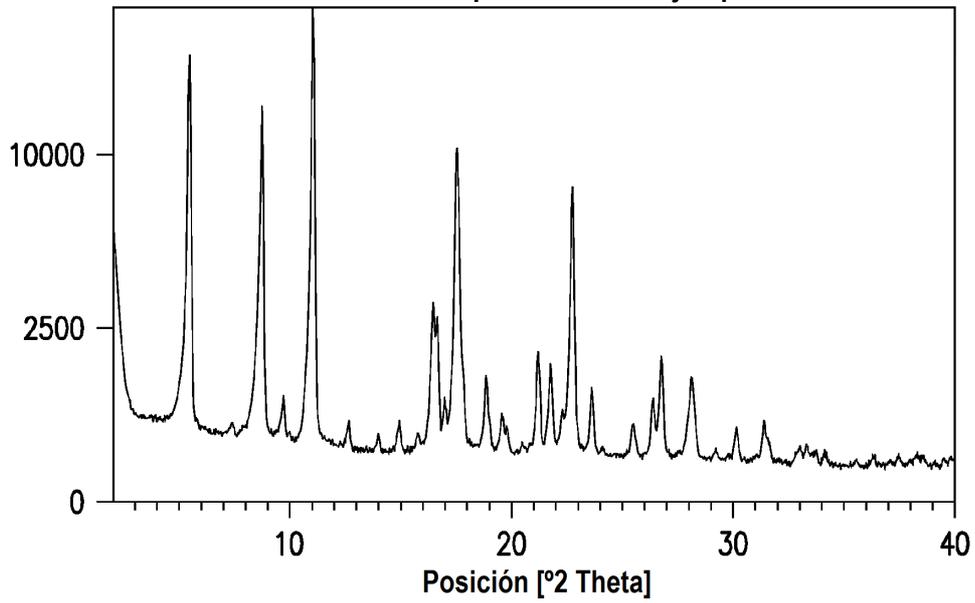


FIG. 2