

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.12.04**

(30) Prioridade(s): **2002.12.09 US 431814 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2012.10.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.11.05**
001/2015

(73) Titular(es):

ASTRAZENECA AB

151 85 SÖDERTÄLJE

SE

(72) Inventor(es):

TRUC CHI VU

US

SERGEI V. KOLOTUCHIN

US

JIANJI WANG

US

KWOK WONG

US

JURONG YU

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO

RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSTOS PARA PRODUZIR INIBIDORES DE DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV E SEUS INTERMEDIÁRIOS**

(57) Resumo:

SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS E COMPOSTOS PARA PRODUÇÃO DE INIBIDORES DE DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV À BASE DE PIRROLIDINA FUNDIDA COM CICLOPROPILO.

RESUMO

"MÉTODOS E COMPOSTOS PARA PRODUZIR INIBIDORES DE DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV E SEUS INTERMEDIÁRIOS"

São proporcionados métodos e compostos para produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS E COMPOSTOS PARA PRODUZIR INIBIDORES DE DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV E SEUS INTERMEDIÁRIOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona métodos e compostos para utilização em métodos para produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo. Também são proporcionados métodos para a aminação redutora assimétrica do composto intermediário ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético utilizado na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo. São também proporcionados compostos intermediários adicionais e métodos para a sua produção. Os inibidores de dipeptidil peptidase IV produzidos pelos compostos e métodos da presente invenção são úteis no tratamento da diabetes e as suas complicações, hiperglicemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidade e aterosclerose e doenças relacionadas, bem como doenças imunomoduladoras e doença inflamatória crónica do intestino.

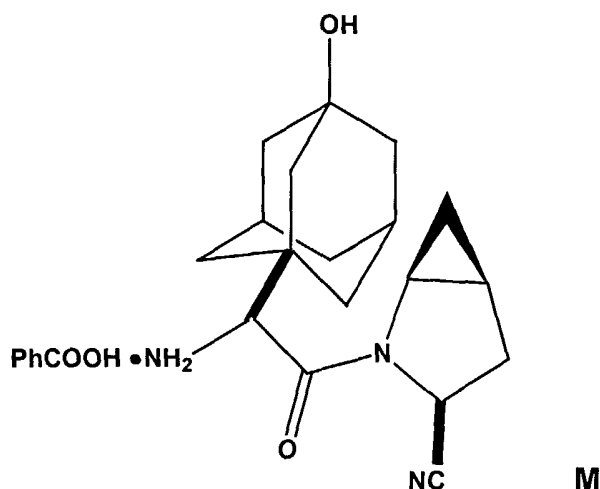
ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A dipeptidil peptidase IV é uma aminopeptidase serina não clássica ligada à membrana que está localizada numa variedade de tecidos incluindo, mas não limitados a, intestino, fígado,

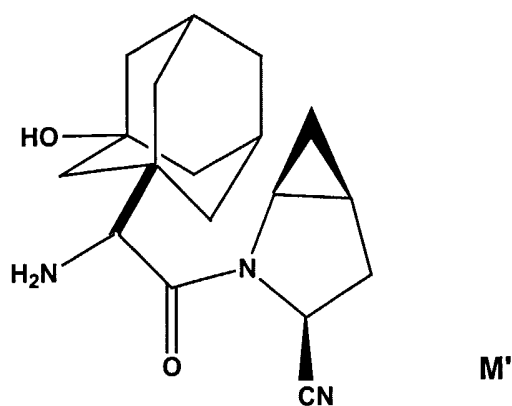
pulmão e rim. Esta enzima também está localizada em linfócitos T circulantes em que é referida como CD-26. A dipeptidil peptidase IV é responsável pela clivagem metabólica dos péptidos endógenos GLP-1(7-36) e glucagons *in vivo* e demonstrou actividade proteolítica contra outros péptidos, tais como GHRH, NPY, GLP-2 e VIP *in vitro*.

O GLP-1(7-36) é um péptido de 29 aminoácidos derivado do processamento pós-tradução do proglucagon no intestino delgado. Este péptido tem múltiplas acções *in vivo*. Por exemplo, o GLP-1(7-36) estimula a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon. Este péptido promove a saciedade e retarda o esvaziamento gástrico. A administração exógena de GLP-1(7-36) por meio de infusão contínua demonstrou ser eficaz em doentes diabéticos. No entanto, o péptido exógeno é degradado muito rapidamente para utilização terapêutica contínua.

Foram desenvolvidos inibidores de dipeptidil peptidase IV para potenciar níveis endógenos de GLP-1(7,36). A patente U.S. Nº 6395767 divulga inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo. Os métodos para sintetizar quimicamente estes inibidores estão divulgados na patente U.S. Nº 6395767, bem como na literatura. Por exemplo, ver Sagnard *et al.* *Tet. Lett.* 1995 36:3148-3152; Tverezovsky *et al.* *Tetrahedron* 1997 53:14773-14792; e Hanessian *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998 8:2123-2128. Um inibidor preferido divulgado na patente U.S. Nº 6395767 é benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) como representado na Fórmula M.



e a base livre correspondente, (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (M') e o seu mono-hidrato (M'')



base livre M' ou seu mono-hidrato M''

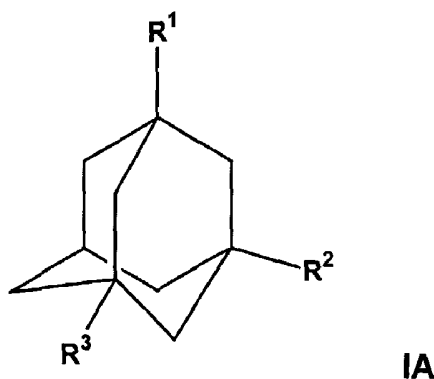
Os métodos adaptados para a preparação de intermediários utilizados na produção deste inibidor de dipeptidil peptidase IV estão divulgados no documento EP 0808824 A2. Ver também Imashiro e Kuroda *Tetrahedron Letters* 2001 42:1313-1315, Reetz *et al. Chem. Int. Ed. Engl.* 1979 18:72, Reetz e Heimbach *Chem. Ber.* 1983 116:3702-3707, Reetz *et al. Chem. Ber.* 1983 116:3708-3724.

A presente invenção proporciona novos métodos de produção e compostos para utilização na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objectivo da presente invenção é proporcionar compostos úteis como intermediários na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo.

Os intermediários aqui divulgados compreendem um composto de Fórmula IA:



em que

R^1 é seleccionado do grupo consistindo em H e OH;

R^2 é seleccionado do grupo consistindo em $-C(=O)-COR^4$, $-C(=O)NR^5R^6$, $-C(X)_n-COR^4$ e $-C-NR^7R^8COR^4$,

em que

X é um halogéneo;

n é desde 1-2

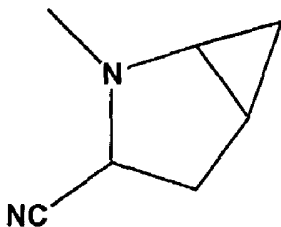
R⁴ é seleccionado do grupo consistindo de O-alquilo, NH₂ e OH; e

R⁵, R⁶, R⁷ e R⁸ são, cada, seleccionados do grupo consistindo de H e COOR⁹, em que R⁹ é um alquilo substituído ou não substituído; e

R³ é seleccionado do grupo consistindo de H, OH e R¹⁰, em que R¹⁰ é NHR¹¹C(=O)R¹²,

R¹¹ é R¹³COOH,

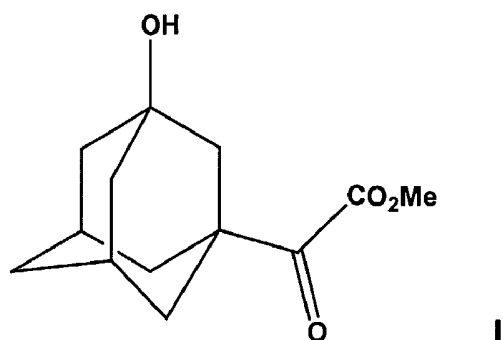
R¹² é



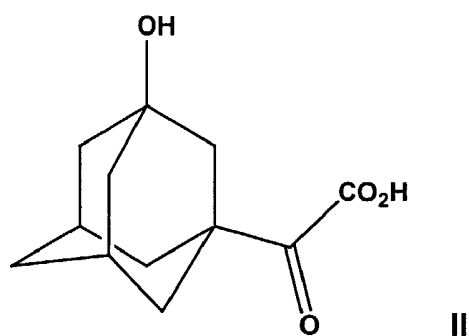
e R¹³ é um alquilo ou arilo.

Os compostos de Fórmula IA úteis como intermediários na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo incluem:

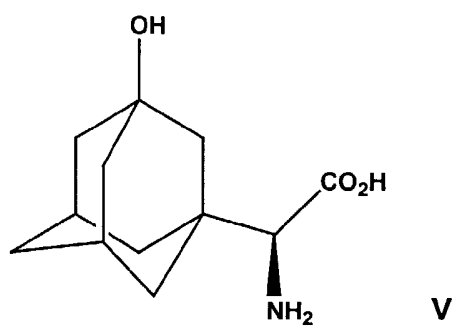
éster metílico do ácido 3-hidroxi-α-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula I,



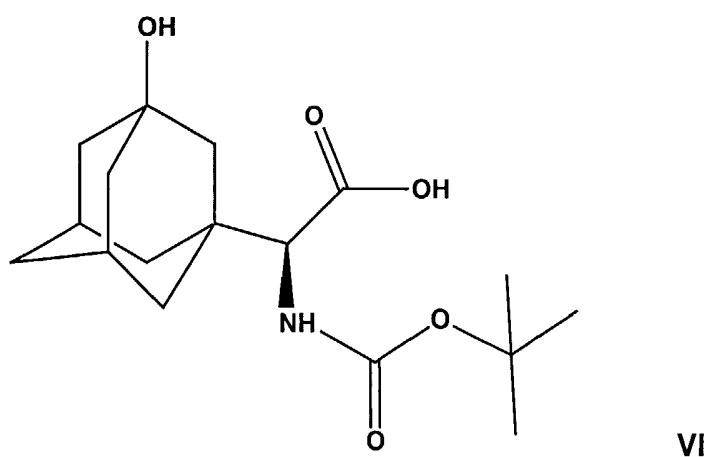
ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula II,



ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula V,

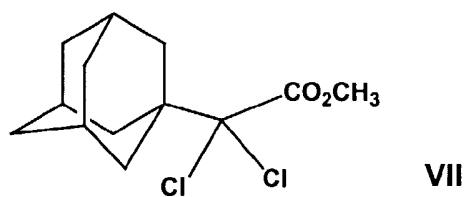


ácido (S)-[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético como representado na Fórmula VI

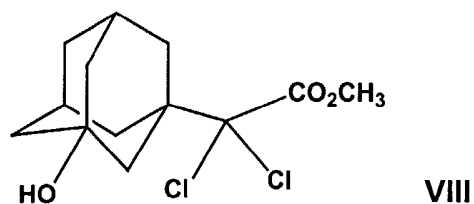


(ou o seu sal DABCO VIA),

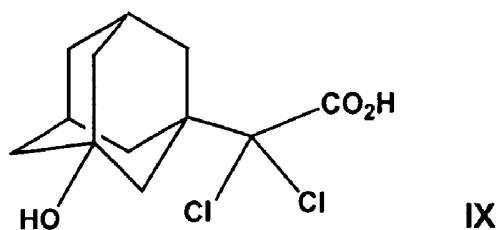
éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético como representado na Fórmula VII



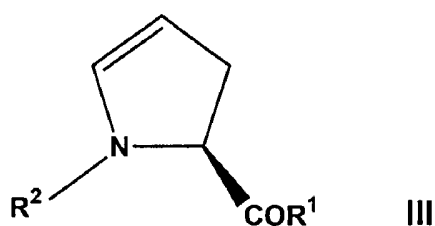
éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético como representado na Fórmula VIII, e



ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético como
representado na Fórmula IX



Outros intermediários aqui divulgados compreendem os compostos éster 1-(1,1-dimetiletílico),5-etílico do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, como representado na Fórmula III,

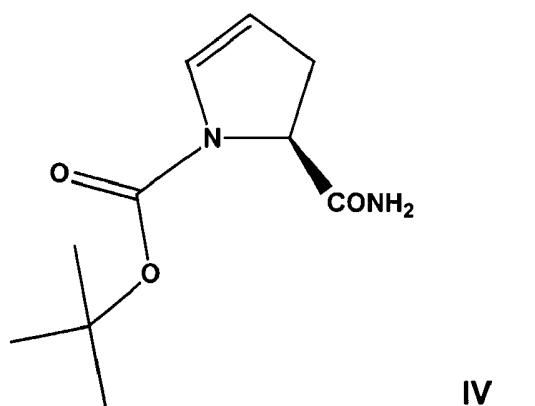


em que

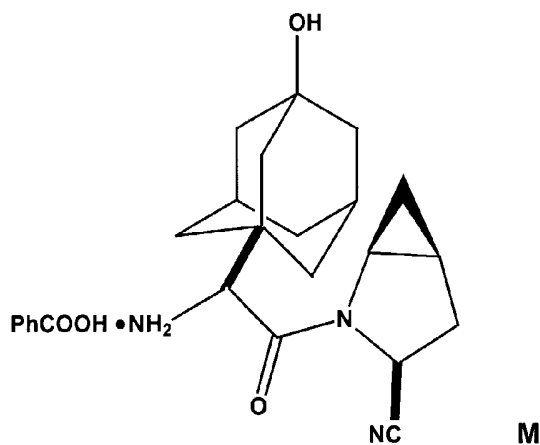
R^1 é seleccionado do grupo consistindo de O-alquilo, NH_2 e OH, e

R^2 é seleccionado do grupo consistindo de t-BOC e CBz;

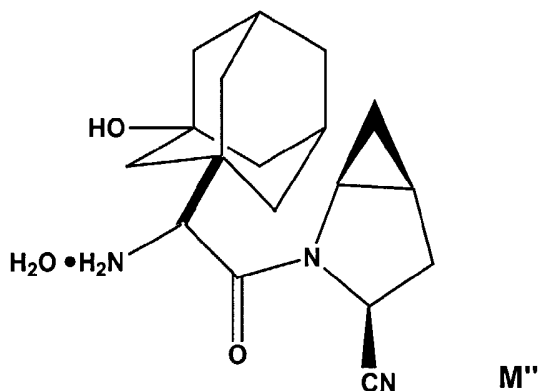
e éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico como representado na Fórmula IV,



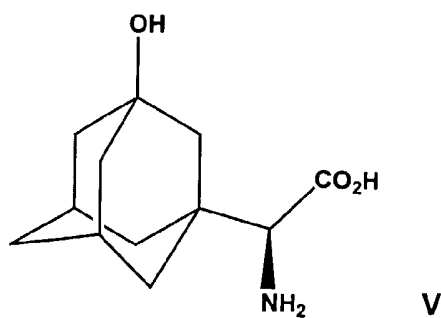
Numa forma de realização preferida, estes compostos são utilizados como intermediários na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo [3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) como representado na Fórmula M



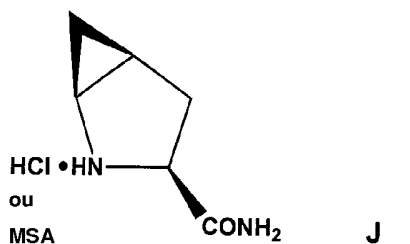
ou a sua base livre M' (apresentada acima) e o seu mono-hidrato M''



Outro objectivo da presente invenção é proporcionar métodos para a produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo. Numa forma de realização preferida, o inibidor produzido é benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) e a sua correspondente base livre, como representada nas Fórmulas M e M', respectivamente. Estes inibidores são finalmente formados a partir do acoplamento de dois fragmentos, ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula V,



e sal de ácido de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida, como o sal cloridrato ou o sal do ácido metanossulfónico (sal de mesilo ou de MSA) como representado na Fórmula J



São aqui divulgados vários métodos para a produção e o acoplamento destes fragmentos, dependendo dos compostos intermediários seleccionados como materiais de partida. Por exemplo, é divulgado um método para a produção do inibidor à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo a partir de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula II. É também divulgado um método para a produção do inibidor à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo a partir de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula V. Noutra forma de realização da presente invenção, é proporcionado um método para a produção do inibidor à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo a partir de ácido (<aS)-<a-[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético de Fórmula VI. É também divulgado um método para a produção do inibidor à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo a partir de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico de Fórmula IV.

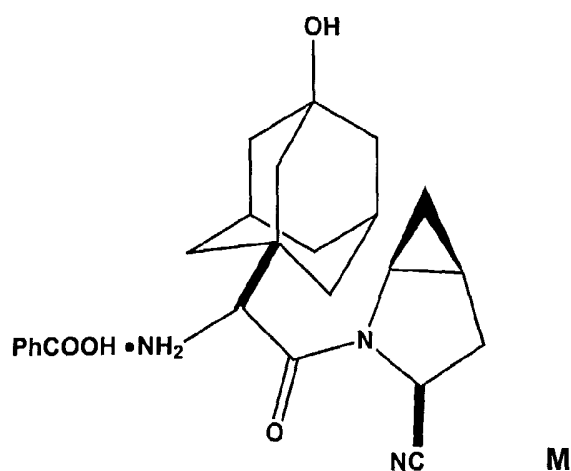
São aqui divulgados métodos para a síntese de intermediários úteis na produção do inibidor à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo. É aqui proporcionado um método para a aminação redutora assimétrica ou transaminação de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). É também divulgado um método para a síntese química de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) a partir de ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N). São também divulgados métodos para a produção de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a partir do éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII), éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII) e ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX). São também divulgados métodos para a produção de éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII), éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII) e ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX). É também divulgado um método para a produção de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV) a partir de éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico (Fórmula III). O éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV) pode então ser utilizado como um intermediário na produção de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H).

É também divulgada uma linha celular capaz de produzir ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) por aminação redutora assimétrica ou transaminação de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). A linha celular compreende células contendo um plasmídeo que expressa formato desidrogenase e fenilalanina desidrogenase. A mais preferida é a linha celular com o número de acesso ATCC PTA-4520.

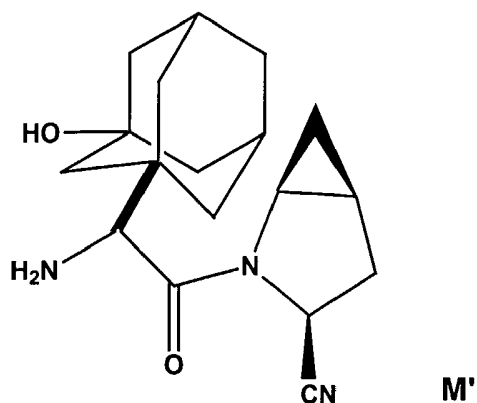
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os compostos à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo, tais como benzoato de (1S,3S,5S)-2[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) e a sua correspondente base livre e o seu mono-hidrato são inibidores de dipeptidil peptidase IV, úteis no tratamento da diabetes e as suas complicações, hiperglicemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidade e aterosclerose e doenças relacionadas, bem como doenças imunomoduladoras e doença inflamatória crónica do intestino. Na presente invenção, são proporcionados novos compostos e métodos para utilização na produção de compostos à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo, tais como benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, (1:1) e a sua correspondente base livre e o seu mono-hidrato.

Os inibidores de dipeptidil peptidase IV benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) está representado abaixo como Fórmula M.

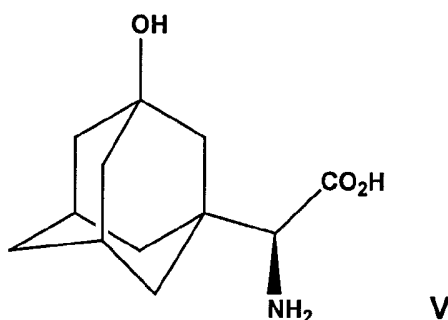


e, de um modo preferido, a correspondente base livre de Fórmula M' representada abaixo ou o seu mono-hidrato M'' aqui indicado anteriormente.

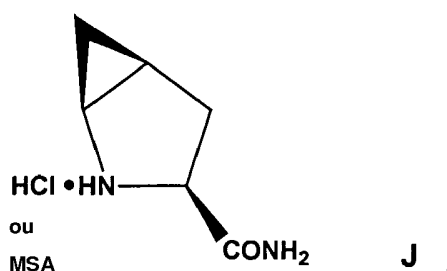


Na presente invenção, é proporcionado um método para a produção de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (Fórmula M') pela junção de dois fragmentos. Estes fragmentos são ácido (<aS)-<a-amino-3-

hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como representado na Fórmula V,



e os sais de ácido de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida, tal como o sal cloridrato ou o sal MSA, como representado na Fórmula J.



A presente invenção também divulga métodos para a produção destes fragmentos, bem como de compostos intermediários úteis na produção destes fragmentos.

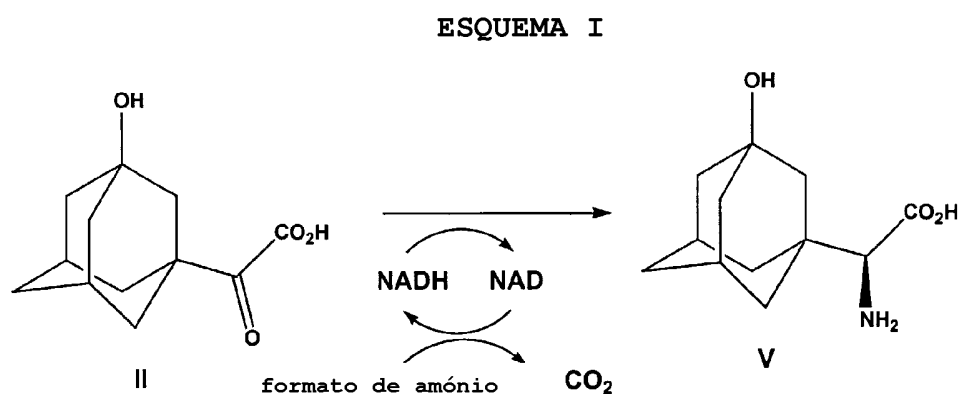
São divulgados métodos para a produção do fragmento ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) por aminação redutora ou transaminação do composto intermediário ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula II). Numa forma de realização preferida deste método, o ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-

acético (Fórmula II) é convertido em ácido (α)- α -amino-3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) por aminação redutora realizada enzimaticamente utilizando uma fenilalanina desidrogenase ou outras desidrogenases de aminoácido activas com cetoácidos. As fenilalanina desidrogenases exemplificativas úteis, na presente invenção incluem as de *Sporosarcina species* ou uma fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces species*, tal como *Thermoactinomyces intermedius*. É preferido que a aminação redutora seja realizada com a fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, expressa em *Escherichia coli* ou *Pichia pastoris*. A construção e crescimento de estirpes recombinantes de *E. coli* e *Pichia pastoris* que expressam fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, foram descritos por Hanson et al. (*Enzyme and Microbial Technology* 2000 26:348-358). O crescimento de *Pichia pastoris* em metanol também induz a produção de formato desidrogenase (Hanson et al., *Enzyme and Microbial Technology* 2000 26:348-358).

As células de *E. coli* contendo um plasmídeo que expressa a formato desidrogenase de *Pichia pastoris* (ATCC 20864) e uma versão modificada do gene de fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces intermedius* (ATCC 33205) foram depositadas e aceites por uma Autoridade Internacional de Depósitos nos termos do Tratado de Budapeste. O depósito foi feito em 25 de Junho de 2002 na American Type Culture Collection em 10801 University Boulevard em Manassas, Virginia 20110-2209. O Número de Acesso ATCC é PTA-4520. Todas as restrições ao acesso do público a esta linha celular serão irrevogavelmente removidas por concessão deste pedido de patente. O Depósito será mantido num depósito público durante um período de trinta anos após a data do

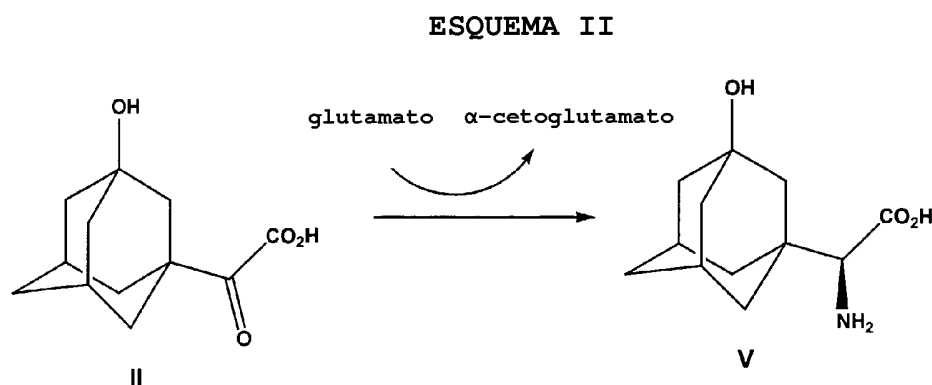
depósito ou de cinco anos após o último pedido de uma amostra ou durante a vigência da patente, consoante o que for mais longo. A linha celular acima referida era viável no momento do depósito. O Depósito será substituído se não puderem ser facultadas pelo depositário amostras viáveis.

A aminação redutora de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) a ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) está representada no seguinte Esquema I.



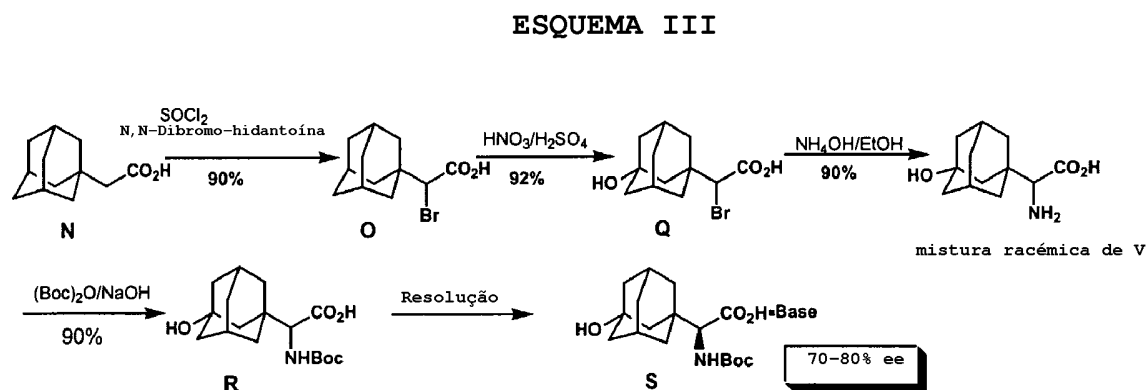
Como mostrado no Esquema I, esta reacção requer amónia e nicotinamida adenina dinucleótido reduzido (NADH). O nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) produzido durante a reacção é reciclado a NADH por oxidação de formato a dióxido de carbono pela formato desidrogenase. O rendimento esperado de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) a partir desta reacção é 80 a 100% e o excesso enantiomérico esperado é superior a 99%. Ver também aqui os exemplos 1 a 10.

A mesma conversão também pode ser conseguida utilizando uma transaminase como mostrado no Esquema II:



Como mostrado no Esquema II, nesta conversão enzimática o ácido glutâmico serve como doador de amino. Uma transaminase exemplificativa para utilização nesta conversão é a transaminase de cadeia ramificada aqui apresentada no Exemplo 11.

O ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) também pode ser sintetizado quimicamente. Um método exemplificativo para a síntese química de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) está representado no Esquema III:



Como mostrado no Esquema III, uma mistura racêmica de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula V) é sintetizada quimicamente a partir de ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) primeiro por bromação de ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético a ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O). Nesta bromação, o material de partida, ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula N) é suspenso em cloreto de tionilo. Adiciona-se então dimetilformamida (DMF) e a suspensão é agitada à temperatura ambiente durante 1,5 horas. A conclusão da reacção é verificada por cromatografia gasosa. Adiciona-se então anidrido N-bromossuccínico (NBS) sólido em porções à mistura reaccional e a mistura reaccional é aquecida a 60 °C. A temperatura é mantida entre 60 e 65 °C, enquanto a reacção é agitada durante 3 horas. Mais uma vez, a conclusão da reacção é verificada por cromatografia gasosa. Adiciona-se então heptano à mistura reaccional e o excesso de cloreto de tionilo é removido por destilação a 78-80 °C. Adiciona-se água para desactivar a reacção e adiciona-se mais heptano. A camada aquosa é, então, separada da camada orgânica e a camada orgânica é lavada com água. Após a lavagem, adiciona-se mais água à camada de heptano e o heptano é removido por destilação. Adiciona-se então tetra-hidrofurano (THF) à camada aquosa restante e a mistura é agitada vigorosamente à temperatura ambiente durante várias horas. Pode adicionar-se mais água para acelerar esta hidrólise. O THF é, então, removido por destilação, deixando uma mistura reaccional bifásica (água e óleo). Adicionam-se então núcleos e deixa-se que a reacção atinja a temperatura ambiente, enquanto é produzido ácido α -bromotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) como um sólido pesado. Adiciona-se água e acetonitrilo para manter a suspensão agitável. Após agitação

durante várias horas, o sólido contendo ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) é removido por filtração e lavado várias vezes com acetonitrilo. Ver também aqui o Exemplo 17.

Faz-se então reagir o ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) com H₂SO₄ e HNO₃ para produzir ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q). De um modo mais específico, o ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) é preparado a partir de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) carregando primeiro um balão de Erlenmeyer com H₂SO₄. O balão é, então, arrefecido num banho de gelo e adiciona-se HNO₃ a 50% ao balão. O ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) sólido é, então, adicionado à mistura, em porções, que mantêm a temperatura abaixo de 28 °C. A reacção é, então, aquecida a 60 °C com agitação até se obter uma solução límpida. Quando a reacção estiver completa, é arrefecida e mantida à temperatura ambiente. Adiciona-se então água para desactivar a reacção. A pasta resultante é arrefecida num banho de gelo e depois filtrada para se obter ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula Q). Ver também aqui o Exemplo 18.

O ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) é, depois, dissolvido em hidróxido de amónio, de um modo preferido, hidróxido de amónio a 30% e a mistura reaccional é aquecida, de um modo preferido, a 65 °C. A mistura reaccional é, então, concentrada a um sólido. Adiciona-se então EtOH e a reacção é novamente concentrada para produzir uma mistura racémica compreendendo ácido (<aS)-<a-amino-3-

hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). Ver também aqui o Exemplo 19.

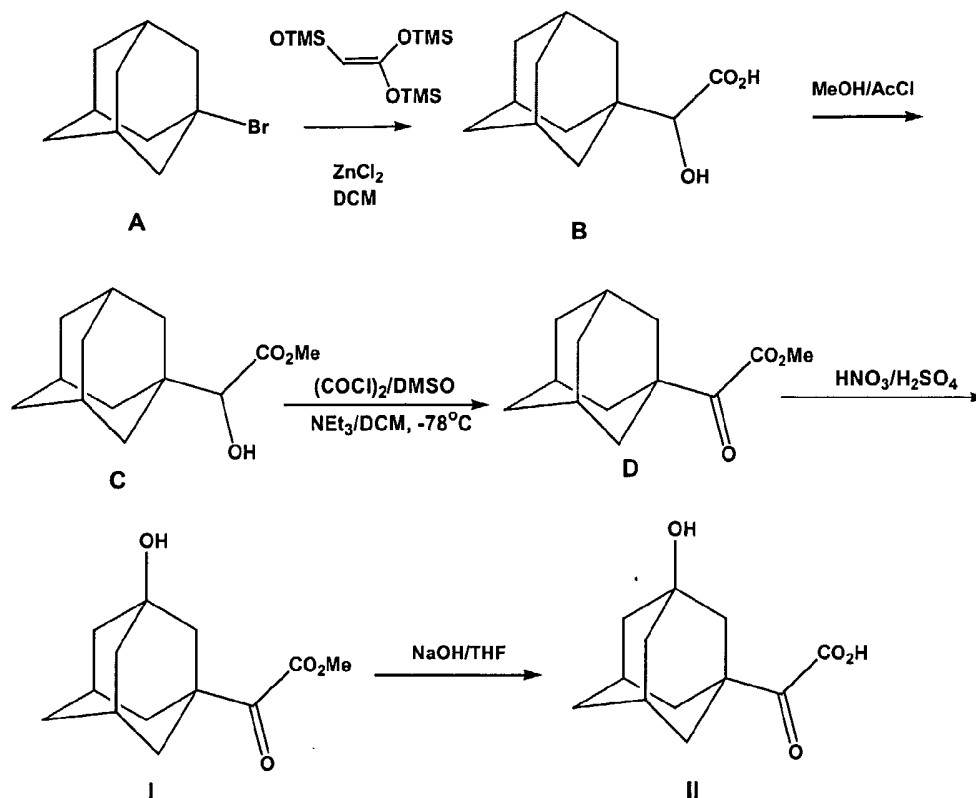
Para isolar o ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (mistura racémica de Fórmula V) a partir da mistura racémica, a mistura é tratada por protecção com Boc típica utilizando anidrido Boc e hidróxido de sódio em tetra-hidrofurano para produzir ácido α -[[1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3]-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Composto R). O ácido α -[[1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3]-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Composto R) é, então, misturado com uma base quiral, tal como [1R,2S]-(-)-1,2-difenil-hidroxi etilamina, 1,7,7-trimetilbiciclo[2.2.1]heptano-2-amina ou S-(-)-1-1(1-naftil)etilamina e a mistura é evaporada até à secura. A mistura seca é ressuspensa num solvente e a mistura ressuspensa é colocada num agitador com aquecimento durante várias horas. Por arrefecimento até à temperatura ambiente, ocorre a cristalização de ácido (α S)- α -[[1-dimetiletoxi)carbonil]-amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Composto S). Ver também aqui o Exemplo 20.

A remoção do grupo Boc produz ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V).

São também aqui divulgados métodos para a produção do composto intermediário ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) utilizado na síntese do fragmento ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V). O composto intermediário ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo-

[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) pode ser produzido de acordo com o método representado no Esquema IV.

ESQUEMA IV

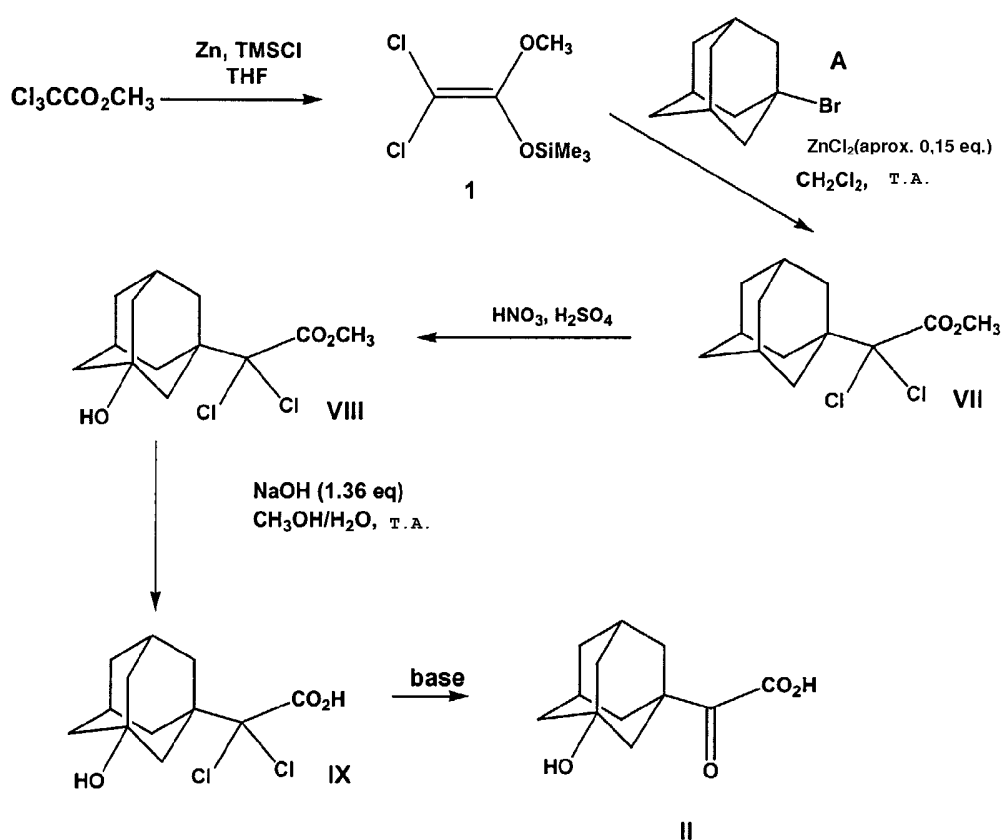


Como mostrado no Esquema IV, neste método, o brometo de adamantilo (Fórmula A) é alquilado por meio de catálise com cloreto de zinco para produzir ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B). O ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) é, então, esterificado utilizando cloreto de acetilo em metanol, para produzir éster metílico do ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula C). O éster metílico do ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula C) é, então, convertido em éster metílico do

ácido α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula D) por oxidação de Swern. O éster metílico do ácido α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula D) é, então, hidroxilado para formar éster metílico do ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula I), que é, então, hidrolisado para formar ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). Ver também aqui os Exemplos 21 a 25.

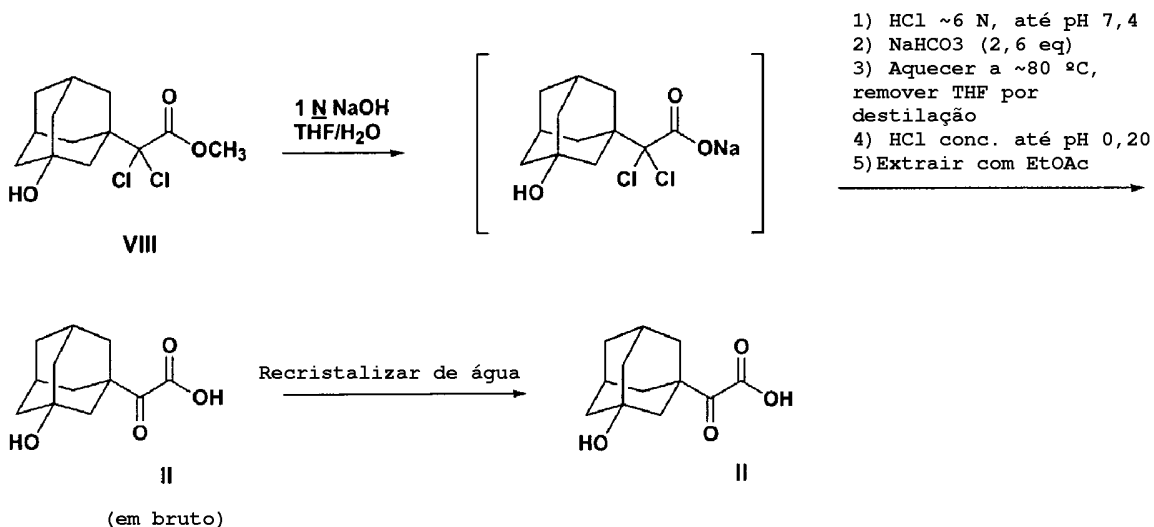
Alternativamente, o composto intermediário ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) pode ser produzido de acordo com o método representado no Esquema V.

ESQUEMA V



Como mostrado no Esquema V, o (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano 1 é preparado por uma pequena modificação do método de Kuroda *et al.*, (documento EP 0808824 A3; Imashiro e Kuroda, *Tetrahedron Letters* 2001 42:1313-1315). O tratamento de bromoadamantano com 1 sob a influência de cloreto de zinco (Reetz *et al.* *Chem. Int. Ed. Engl.* 1979 18:72, Reetz e Heimbach *Chem. Ber.* 1983 116:3702-3707, Reetz *et al.* *Chem. Ber.* 1983 116: 3708-3724) produz o éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético de Fórmula VII. O éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloroacético de Fórmula VII é, então, hidroxilado com óxido nítrico em ácido sulfúrico concentrado para proporcionar um rendimento quantitativo de éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula VIII. A hidrólise da Fórmula VIII com hidróxido de sódio aquoso em metanol, à temperatura ambiente, produz ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula IX. O tratamento subsequente do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX) com uma base fraca, de um modo preferido, bicarbonato de sódio, a temperatura elevada, resulta na formação exclusiva do composto intermediário ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II). Ver também os Exemplos 26 até 29.

ESQUEMA VA

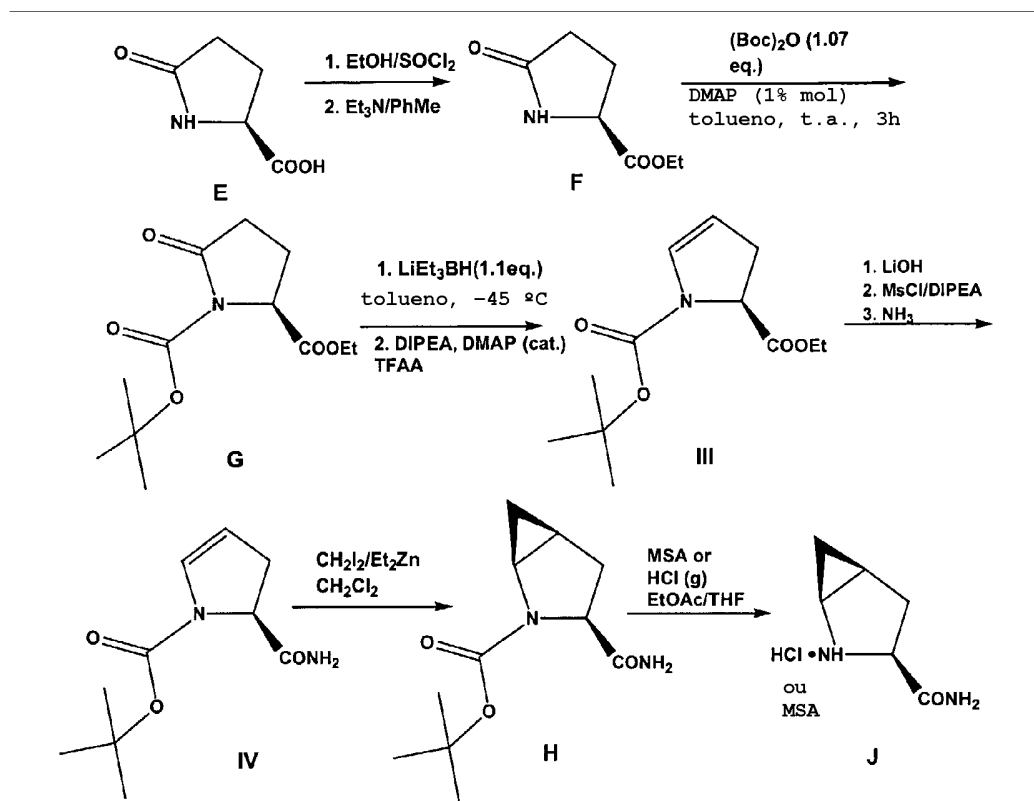


Como mostrado no Esquema VA, o composto intermediário ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula II) pode ser preparado num procedimento num só reactor. Como se pode ver, o tratamento do composto de Fórmula VIII com hidróxido de sódio aquoso em tetra-hidrofurano (ou outra base como hidróxido de potássio ou hidróxido de lítio) numa atmosfera inerte, tal como árgon, produz o sal de sódio correspondente. Sem recuperar o sal de sódio, a mistura reaccional contendo o sal de sódio é tratada com um ácido, tal como ácido clorídrico, para baixar o pH para menos do que cerca de 0,50, de um modo preferido, cerca de 0,20, para formar o correspondente ceto ácido II, que pode ser recristalizado a partir de água para formar cristais do ceto ácido II.

É também aqui divulgado um método para produção do fragmento (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J). Este fragmento utilizado na produção de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxi-triciclo-[3.3.1.^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-

azabicciclo-[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo pode ser produzido de acordo com o método representado no Esquema VI mostrado abaixo.

ESQUEMA VI



Como mostrado no Esquema VI, o ácido L-pirolglutâmico (Fórmula E) é primeiro esterificado para produzir o éster etílico do ácido L-pirolglutâmico (Fórmula F; SQ 7539). Este éster etílico do ácido L-pirolglutâmico é, então, protegido com BOC no azoto para produzir éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido (5S)-2-oxopirrolidino-1,5-dicarboxílico (Fórmula G). É, então, realizada a redução com super-hidreto e eliminação para formar éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico (Fórmula III). O BOC-DHPEE III é, então, hidrolisado por saponificação

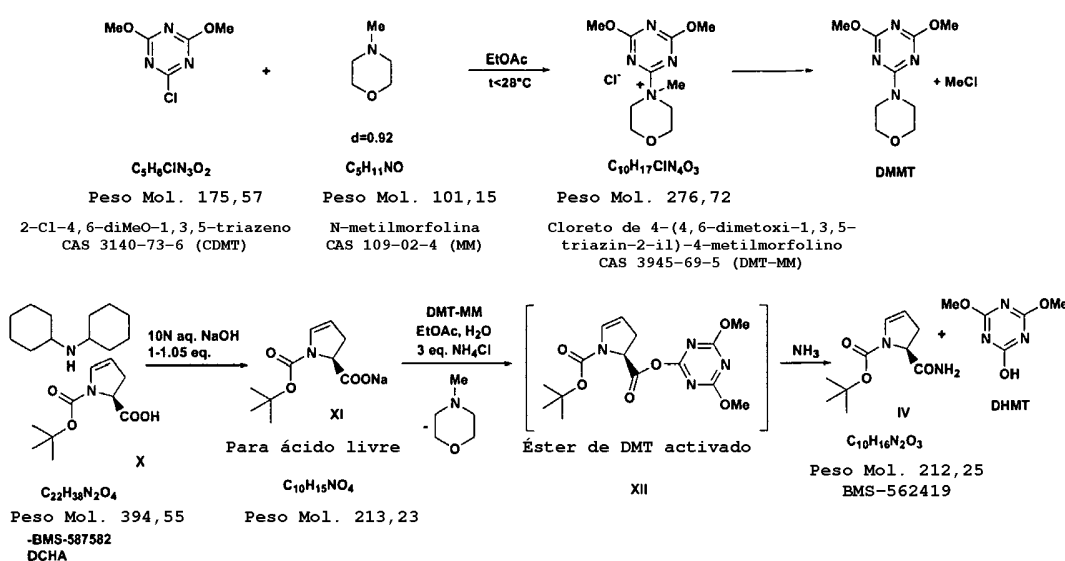
com hidróxido de lítio para formar BOC-DHP. Uma amida é, então, formada no BOC-DHP por meio do anidrido misturado utilizando cloreto de mesilo, seguido por amónia para produzir éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico, (Fórmula IV). O éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico, (Fórmula IV) é, então, ciclopropanado por meio da reacção de Simmons-Smith, para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H). O BOC é, então, removido, resultando na formação de um sal de ácido como o sal cloridrato ou o sal do ácido metanossulfónico do fragmento (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J). Ver também do Exemplo 29 ao Exemplo 35.

É também aqui divulgada e representada no Esquema VI a transformação de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV) em éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H) por ciclopropanação numa reacção de Simmons-Smith. Nesta reacção, o éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico é dissolvido em cloreto de metileno num primeiro reactor. Num segundo reactor, o cloreto de metileno é arrefecido para -30 °C e adiciona-se dimetoxietano e uma solução a 30% de dietilzinco em tolueno, seguidos pela adição de diiodometano. Esta mistura é, então, adicionada ao primeiro reactor, seguida pela adição de solução saturada de bicarbonato. A mistura reaccional resultante é agitada até se ter formado um precipitado. O precipitado é, então, filtrado, lavado e ressuspenso em cloreto de metileno

duas ou mais vezes. Os filtrados são então separados em fases aquosa e orgânica e a fase orgânica é lavada com solução aquosa semi-saturada de cloreto de sódio. O solvente é removido e trocado por heptano para se obter uma suspensão de produto em bruto de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a]-3-aminocarbonil)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (Fórmula H) em heptano.

Alternativamente, o éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV) pode ser preparado como mostrado no Esquema VIA.

ESQUEMA VIA



Como mostrado no Esquema VIA, o sal DCHA de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico X é tratado com uma base de metal alcalino, tal como hidróxido de sódio para formar o sal correspondente, tal como o sal de sódio.

O sal de sódio de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico XI também pode ser preparado a partir do éster etílico correspondente por tratamento do éster etílico (de um modo preferido, uma solução do éster etílico em tolueno) com etanol e hidróxido de sódio.

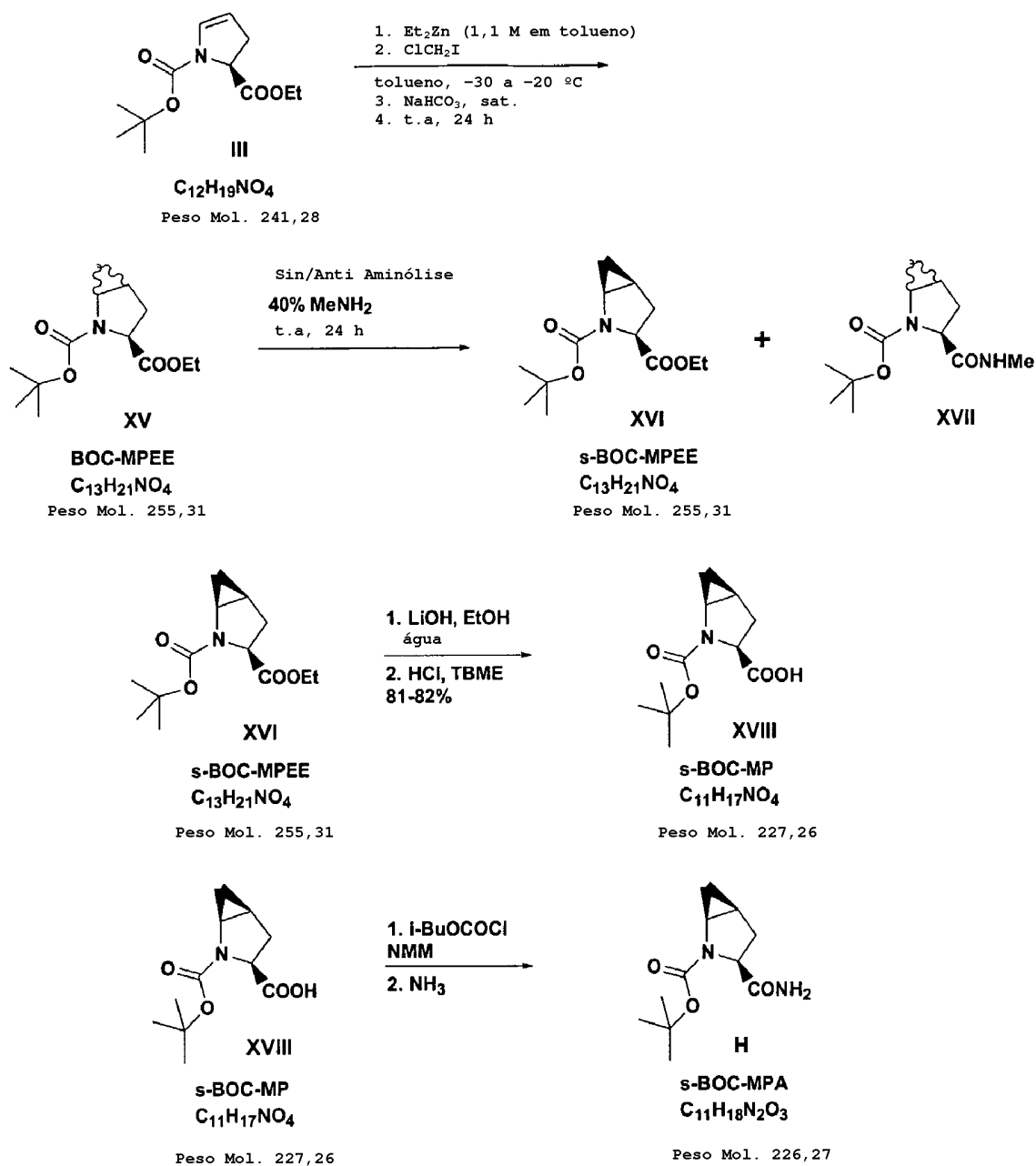
Uma solução do sal de sódio XI é tratada com tampão, tal como cloreto de amónio e di-hidrogenofosfato de sódio para baixar o pH da solução abaixo de 7, de um modo preferido, cerca de 6 a 6,5, e a solução tamponada de sal de sódio é tratada com cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMT-MM), para formar o éster de DMT activado XII que é tratado com amónia ou outra base, tal como sulfato de amónio, cloreto de amónio ou hidróxido de amónio, para formar éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico IV.

O cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMT-MM) pode ser preparado como mostrado no Esquema VIA por reacção de 2-Cl-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) e N-metilmorfolina, a temperaturas reduzidas variando desde cerca de 0 a cerca de 10 °C, para formar DMT-MM.

O sal DCHA do éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico X pode ser preparado a partir do correspondente sal de sódio XI por tratamento de uma solução aquosa de sal DCHA X previamente preparada com éter metil-t-butílico (MTBE) ajustando o pH da mistura reaccional para 2,5-3 empregando um ácido, tal como H_3PO_4 . A camada orgânica é separada e tratada com solução aquosa saturada de cloreto de sódio para formar o correspondente sal de sódio XI. A mistura

reaccional resultante é arrefecida e tratada com DCHA para formar o correspondente sal DCHA X.

ESQUEMA VIB



O composto H do Esquema VI também pode ser preparado como mostrado no Esquema VIB por ciclopropanação de éster etílico de N-BOC 4,5-desidroprolina III como se segue.

O éster etílico de N-BOC 4,5-desidroprolina III é tratado com dietilzinco e cloroiodometano na presença de um solvente orgânico seco, tais como tolueno, cloreto de metileno ou dicloroetano, a uma temperatura reduzida variando desde cerca de -30 a cerca de 0 °C para formar éster etílico de N-BOC 4,5-metanoprolina XV.

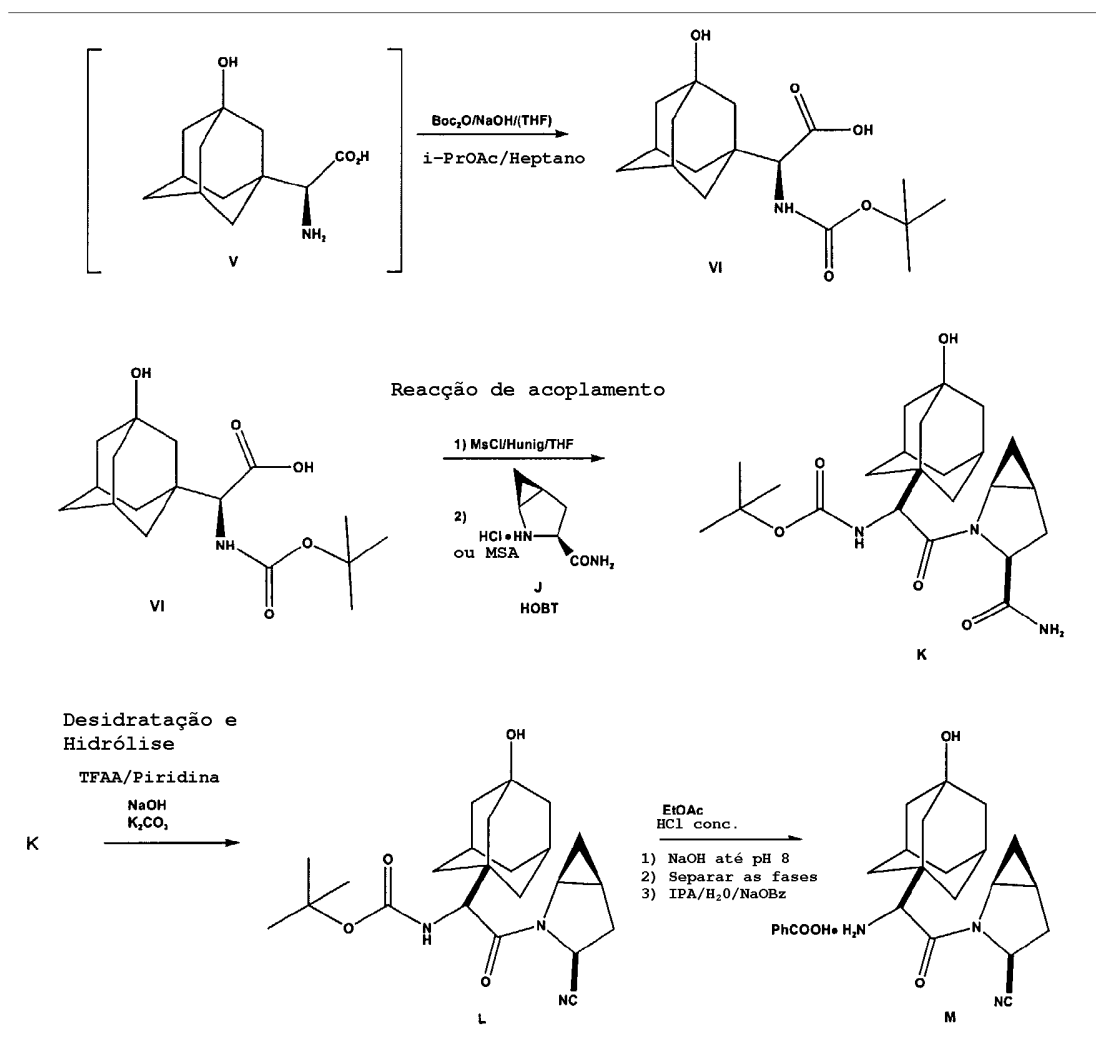
O éster etílico de BOC 4,5-metanoprolina XV resultante (mistura de sin e anti-isómeros (8:1)) é separado por tratamento com metilamina aquosa sob uma atmosfera inerte, tal como uma atmosfera de azoto e é recuperado o éster etílico de sin(S)-BOC-4,5-metanoprolina XVI (separado de XVII).

O éster etílico de s-BOC-4,5-metanoprolina XVI em etanol ou outro solvente orgânico, tais como tolueno ou THF, é tratado com base, tais como hidróxido de lítio, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio aquoso para formar o correspondente ácido livre de s-BOC-metanoprolina XVIII.

O ácido livre XVIII é convertido na correspondente amida de s-BOC-metanoprolina H por tratamento do ácido livre XVIII dissolvido num solvente orgânico, tais como THF ou cloreto de metileno; cloroformato de isobutilo ou cloreto de mesilo, na presença de N-metilmorfolina, sob temperaturas reduzidas de modo a não exceder cerca de -8 °C e depois tratando a mistura reaccional com amónia para formar a amida de s-BOC-metanoprolina H.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para o acoplamento dos fragmentos ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) e (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) para produzir benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1). O acoplamento destes fragmentos está representado no Esquema VII abaixo.

ESQUEMA VII



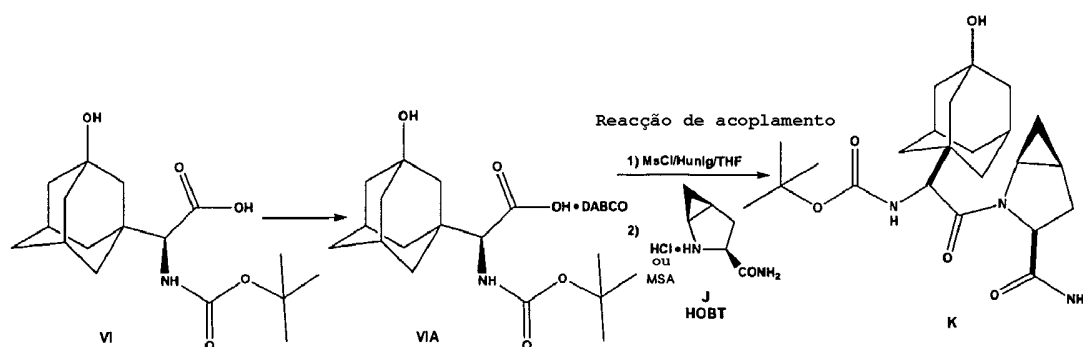
Como mostrado no Esquema VII, o fragmento ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) é primeiro protegido com BOC para produzir ácido (<aS)-<a-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) por tratamento de V com BOC₂O na presença de base, tal como hidróxido de sódio e separado por meio de extracção com acetato de etilo (EtOAc), para separar o ácido livre VI. Alternativamente, em vez de acetato de etilo, pode ser empregue acetato de isopropilo/heptano para separar por cristalização o ácido livre VI. Noutra forma de realização, o composto de Fórmula V é utilizado sem isolamento a partir de uma bioconversão utilizando um concentrado enzimático de PDH/FDH isolado como descrito no Exemplo 8A.

Uma solução do composto de Fórmula VI num solvente orgânico apropriado, tal como tetra-hidrofurano (THF) (arrefecido a uma temperatura na gama desde cerca de -10 a cerca de 0 °C) é tratada com cloreto de metanossulfonilo (Cl de mesilo) e base de Hunig (diisopropiletilamina ou DIPEA), para formar o correspondente sal do ácido metanossulfónico de VI.

É, então, utilizada uma reacção de acoplamento para acoplar sal do ácido metanossulfónico do ácido (<aS)-<a-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) a (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) na presença de 1-hidroxibenzotriazole (HOBT) ou outro agente de acoplamento conhecido para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula K). O composto de Fórmula K é submetido a desidratação por tratamento do

composto K com base orgânica, tais como piridina ou trietilamina e anidrido trifluoroacético e, depois, submetendo a reacção a hidrólise por arrefecimento desde cerca de 0 a cerca de 10 °C e adicionando hidróxido de sódio ou outra base forte, tais como KOH ou LiOH, para formar o Composto L. O éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula L), o qual é depois desprotegido (e tratado com benzoato de sódio) para formar o inibidor de dipeptidil peptidase IV benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) (Fórmula M). Ver também aqui os Exemplos 37 até 39.

ESQUEMA VIIA



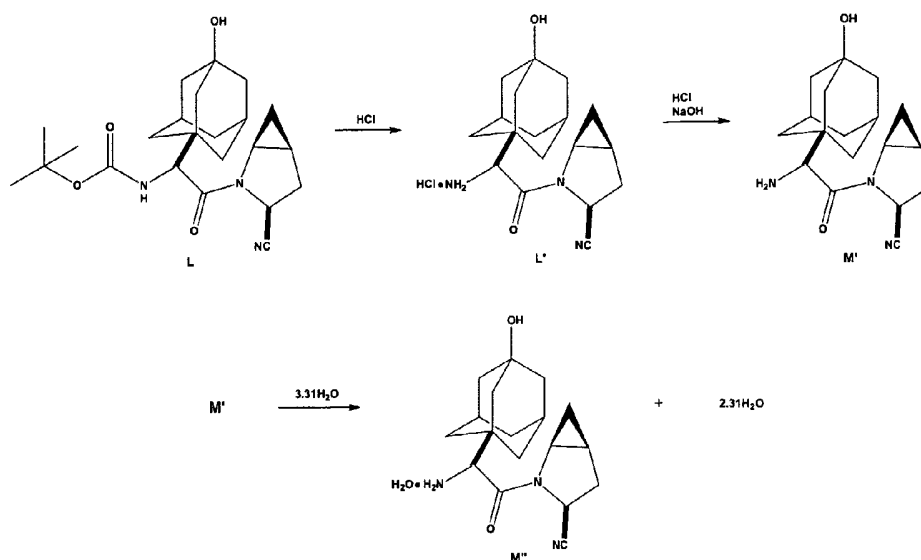
Como mostrado no Esquema VIIA, o composto K também pode ser preparado a partir do composto VIA (sal DABCO) como se segue.

O ácido de Fórmula VI é tratado com o 1,4-diazabicciclo[2,2,2]octano (DABCO) para formar sal 1,4-diazabicciclo[2.2.2]-octano do ácido (α S)- α [[1,1-dimetiletoksi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]

decano-1-acético (Fórmula VIA). Uma reacção de acoplamento (como descrita no Esquema VIIA) é, então, utilizada para acoplar sal 1,4-diazabicciclo[2.2.2]octano do ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VIA) a sal HCl ou MSA de (1S,3S,5S)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) na presença de 1-hidroxibenzotriazole (HOBT) ou outro agente de acoplamento conhecido para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico, (Fórmula K).

Com referência novamente ao Esquema VII, o composto L pode ser desprotegido por tratamento com ácido forte como ácido clorídrico, como descrito em relação ao Esquema VIIB.

ESQUEMA VIIB



Com referência ao Esquema VIIB, o mono-hidrato da base livre M'' pode ser formado como se segue a partir do intermediário L protegido com BOC.

O intermediário L protegido com BOC, é tratado com ácido clorídrico concentrado na presença de cloreto de metileno e metanol, mantendo a temperatura da reacção dentro da gama desde cerca de 20 e 25 °C, para formar o sal cloridrato L'. O sal cloridrato L' é tratado com ácido clorídrico e depois hidróxido de sódio ou outra base forte para formar a base livre M'. A base livre M' é, então, tratada com água para formar o mono-hidrato da base livre M''.

Como será entendido pelos especialistas na técnica por leitura desta divulgação, o produto final, o inibidor de dipeptidil peptidase IV benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) (Fórmula M) ou a sua correspondente base livre M' ou o seu mono-hidrato M'' pode ser produzido utilizando todos os passos representados nos Esquemas I, II, ou III e IV, V, VI, VII e VIIA ou apenas uma parte dos passos representados em qualquer dos Esquemas I, II, ou III e IV, V, VI, VII e VIIA, dependendo de qual o intermediário seleccionado como o material de partida. Por exemplo, utilizando os ensinamentos da presente invenção, um especialista na técnica pode produzir em rotina o inibidor à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) (Fórmula M) ou a base livre correspondente M' utilizando como o material de partida ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula II, ácido (<aS)-<a-amino-3-

hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético de Fórmula V, sal 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano do ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético de Fórmula VIA ou éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico de Fórmula IV.

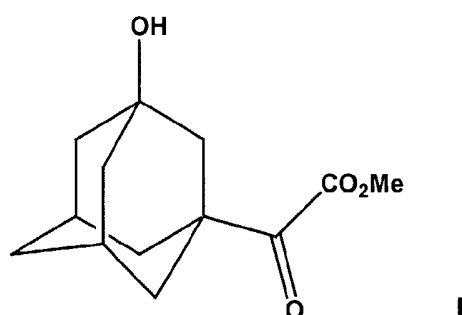
Deste modo, um especialista na técnica pode produzir um inibidor de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo simplesmente por acoplamento de ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) (ou o seu sal DABCO (Fórmula VIA)) a (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula K); desidratar éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-(aminocarbonil)-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula K) para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula L); e hidrolisar éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula L) para formar o inibidor de dipeptidil peptidase IV. Neste método os materiais de partida compreendem os fragmentos de ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula VI) (ou o seu sal DABCO (Fórmula VIA)) e (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J).

Contudo, o método pode ainda compreender passos para a produção do fragmento de ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) a partir do intermediário ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) por meio de protecção com BOC. Nesta forma de realização, o método pode ainda compreender a produção do intermediário ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) por redução assimétrica de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II), por aminação ou transaminação enzimática (ver Esquema I ou II). Alternativamente, o método pode compreender ainda a síntese química de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) a partir de ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Formula N) de acordo com o Esquema III.

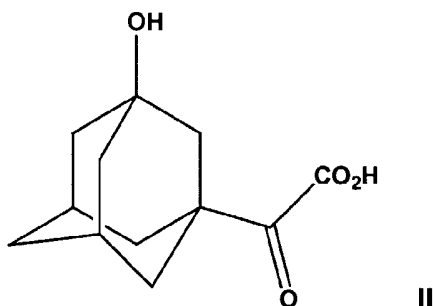
Além disso, ou alternativamente, o método pode ainda compreender passos para a produção do fragmento (1S,3S,5S)-2-azabíciclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J) por remoção de BOC do intermediário éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabíciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (Fórmula H). Nesta forma de realização, o método pode ainda compreender um passo para a produção de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-aminocarbonil)-2-azabíciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (Fórmula H) por ciclopropanação, de um modo preferido, por meio de uma reacção de Simmons-Smith de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV).

São aqui divulgados novos compostos aqui identificados como sendo intermediários úteis na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo. Os compostos úteis como intermediários na produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo incluem:

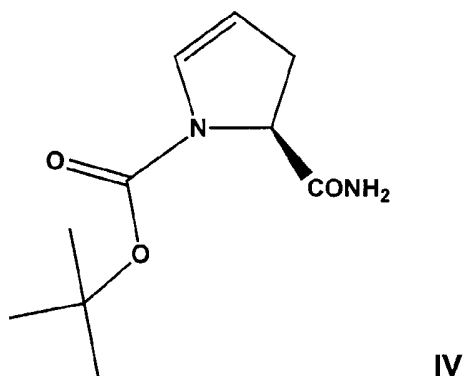
éster metílico do ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula I,



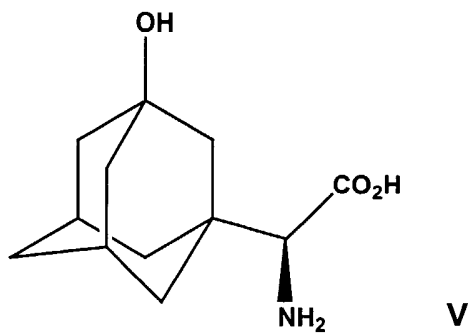
ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula II,



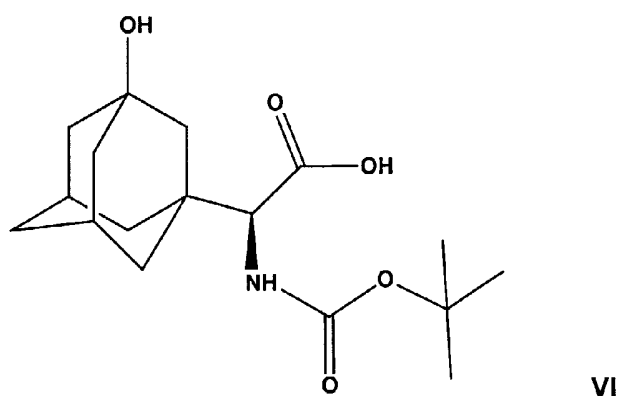
éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico, como representado na Fórmula IV,



ácido (αS)-α-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula V,

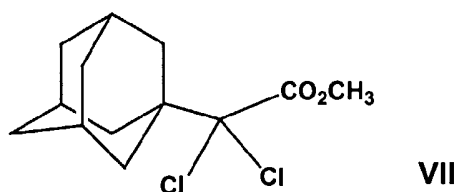


ácido (α S)- α [(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, como representado na Fórmula VI,

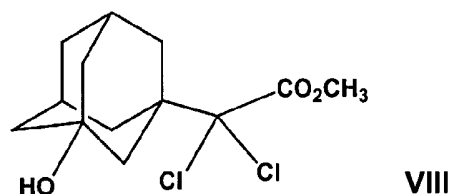


(ou o seu sal DABCO VIA),

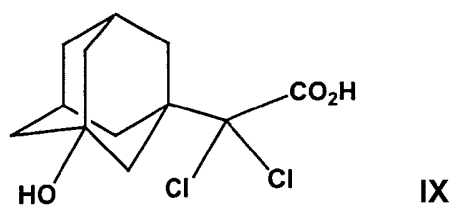
éster metílico do ácido adamantano-1-il-dicloro-acético, como representado na Fórmula VII,



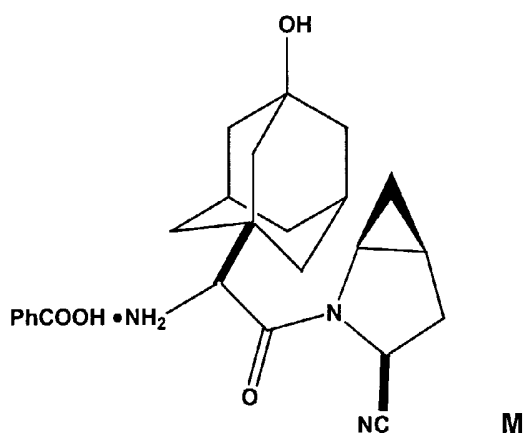
éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético, como representado na Fórmula VIII, e



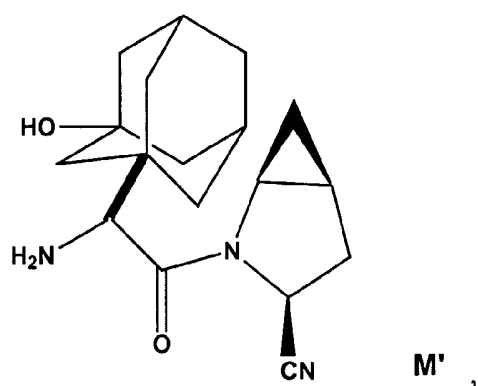
ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético, como representado na Fórmula IX.



Como aqui mostrado, estes compostos são utilizados como intermediários na produção dos inibidores de dipeptidil peptidase IV benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxi-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo [3.1.0]hexano-3-carbonitrilo (1:1) como representado na Fórmula M.



e, de um modo preferido, a base livre correspondente ou o seu mono-hidrato, como representado nas Fórmulas M' e M'', respectivamente



ou o seu mono-hidrato M'' (apresentado anteriormente).

A inibição de dipeptidil peptidase IV produzida, utilizando os compostos e métodos da presente invenção são úteis no tratamento da diabetes e as suas complicações, hiperglicemia, Síndrome X, hiperinsulinemia, obesidade e aterosclerose e doenças relacionadas, bem como doenças imunomoduladoras e doença inflamatória crónica do intestino.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Aminação redutora utilizando um extracto de *Pichia pastoris* recombinante expressando fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces intermedius* e produzindo uma formato desidrogenase endógena

Células congeladas de *Pichia pastoris* recombinante (2,25 kg) que expressam fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces intermedius* foram adicionadas a água desionizada (6,75 L) contendo formato de amónio (28,65 g, 0,454 moles). Após descongelação, as células foram suspensas utilizando um homogeneizador Janke and Kunkel Ultraturrax T25, ajustadas para pH 7 com NH₄OH concentrado e arrefecidas com gelo picado para produzir uma suspensão de células a 25% p/v em formato de amónio 50 mM. As células foram rompidas por 2 passagens através de um microfluidificador a 12000 psi e foram removidos detritos de células por centrifugação a 20000 x g e 4 °C. 7024 mL de sobrenadante, contendo 230998 unidades ou 124641 unidades de actividade de fenilalanina desidrogenase, como determinado pelo Ensaio A (ver Exemplo 9) ou pelo Ensaio B (ver Exemplo 10), respectivamente, e 80080 unidades de formato desidrogenase foram adicionados a um recipiente de 16 L de um biorreactor Bioflo IV de New Brunswick Scientific.

Uma solução de 7024 mL foi preparada contendo formato de amónio (442,5 gramas, 7,017 moles) e ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético (786,7 gramas, 3,510 moles). O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com 276 mL de hidróxido de amónio concentrado. O nicotinamida adenina dinucleótido (NAD;

9,834 gramas, 14,82 mmoles) e ditiotreitol (2,163 gramas, 14,027 mmoles) foram então adicionados e a solução foi adicionada ao biorreactor contendo o extracto de *Pichia pastoris*. A solução foi mantida a 40 °C e agitada a 150 rpm. Alíquotas de hidróxido de amónio concentrado de 45, 25 e 27 mL foram adicionadas às 0, 3 e 18 horas, respectivamente, após o início da reacção para ajustar o pH para 8,0. Após 25 horas, a solução continha 818,9 gramas (3,637 moles, 100% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético, como medido por análise por HPLC (ver Exemplo 8, Método 2) e nenhum ceto ácido ou enantiómero R detectável do aminoácido.

O ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético foi isolado por meio de um procedimento consistindo de levar em ebulição a mistura de transformação enzimática para remover a amónia, ajustamento para pH 3 com ácido fórmico, filtração para remover proteínas precipitadas, sorção do aminoácido em resina Dowex 50 (H+), eluição com amónia 1,5 M e concentração do efluente rico para produzir ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético como um sólido cristalino. O último ensaio utilizando este procedimento de isolamento (entrada de 787 gramas de cetoácido) produziu 804 gramas de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético com uma potência de 94,3% e um rendimento de 96,0% a partir de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético. Todos os lotes de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético isolado por este procedimento tiveram bom desempenho em reacções subsequentes na via para o benzoato (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo.

EXEMPLO 2

Aminação redutora utilizando células secas pelo calor de *Pichia pastoris* recombinante

Foi preparada uma solução contendo num volume final de 4,0 mL a pH 8,0 (pH ajustado com NH_4OH): formato de amônio 0,50 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,25 M, NAD 1,06 mM, ditiotreitól 1,00 mM e 250 mg de células secas pelo calor de *Pichia pastoris* recombinante contendo 32,7 unidades de fenilalanina desidrogenase, como determinado pelo Ensaio A e 24,6 unidades de formato desidrogenase. A preparação de células secas pelo calor de *Pichia pastoris* foi descrita por Hanson *et al.* (*Enzyme and Microbial Technology* 2000 26:348-358). A solução foi incubada num balão de Erlenmeyer de 50 mL a 40 °C, 100 rpm, durante 4 dias, depois, foi analisada por HPLC. A solução continha 45,02 mg/mL (80% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

EXEMPLO 3

Aminação redutora utilizando células húmidas de *Pichia pastoris* recombinante

Foi preparada uma solução contendo num volume final de 3,0 mL a pH 8,0 (pH ajustado com NH_4OH): formato de amônio 0,415 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,208 M, NAD 0,88 mM, ditiotreitól 0,84 mM e 12,5% p/v de células húmidas de *Pichia pastoris* contendo 6,06 unidades de fenilalanina desidrogenase, como determinado pelo Ensaio A e 12,8 unidades de

formato desidrogenase. A solução foi incubada num balão de Erlenmeyer de 50 mL a 40°C, 200 rpm durante 68 horas, depois, foi analisada por HPLC. A solução continha 31,9 mg/mL (68% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

EXEMPLO 4

Aminação redutora utilizando células secas pelo calor de *Escherichia coli* recombinante que expressa fenilalanina desidrogenase de *Thermoactinomyces intermedius* e formato desidrogenase de *Candida boidinii*

Foi preparada uma solução contendo, num volume final de 4,0 mL a pH 8,0 (pH ajustado com NH₄OH): formato de amônio 0,50 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,25 M, NAD 1,06 mM, ditiotreitol 1,00 mM, 2,55 unidades/mL (0,51 unidades/mg) de formato desidrogenase de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim) e 250 mg de células secas pelo calor de *Escherichia coli* recombinante contendo 76 unidades de fenilalanina desidrogenase, como determinado pelo Ensaio A. A solução foi incubada num balão de Erlenmeyer de 50 mL a 40 °C, 100 rpm, durante 4 dias, depois foi analisada por HPLC. A solução continha 7,69 mg/mL (13,7% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

EXEMPLO 5

Aminação redutora utilizando células húmidas de *Escherichia coli* recombinante e formato desidrogenase de *Candida boidinii*

Foi preparada uma solução contendo, num volume final de 3,0 mL a pH 8,0 (pH ajustado com NH_4OH): formato de amónio 0,415 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,208 M, NAD 0,88 mM, ditiotreitól 0,84 mM, 1 unidade/mL (0,51 unidades/mg) de formato desidrogenase de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim) e 12,5% p/v de células húmidas de *Escherichia coli* contendo 97 unidades de fenilalanina desidrogenase, como determinado pelo Ensaio A. A solução foi incubada num balão de Erlenmeyer de 50 mL a 40 °C, 200 rpm durante 68 horas, depois foi analisada por HPLC. A solução continha 5,16 mg/mL (11,0% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

EXEMPLO 6

Aminação redutora utilizando fenilalanina desidrogenase de *Sporosarcina species* e formato desidrogenase de *Candida boidinii*

Foi preparada uma solução contendo, num volume final de 1,0 mL a pH 8,5 (pH ajustado com NH_4OH) formato de amónio 0,15 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,05 M (11,2 mg/mL), NAD 1 mM, ditiotreitól 1 mM, 0,51 unidades/mL (0,51 unidades/mg) de formato desidrogenase de *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim) e 1,01 unidades/mL de fenilalanina desidrogenase (14,5 unidades/mg; Sigma Chemical Co.) de *Sporosarcina species*. A solução foi incubada a 30 °C durante

20 horas, depois, foi analisada por HPLC. A solução continha 0,31 mg/mL (2,74% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantant-1-il)-acético.

EXEMPLO 7

Construção de plasmídeo pBMS2000-PPFDH-PDHmod

Utilizou-se uma construção em dois passos do vector de expressão pBMS2000-PPFDH-PDHmod. O gene FDH de *P. pastoris* foi subclonado no vector de expressão pBMS2000 (pBMS2000 está divulgado na patente U.S. Nº 6068991, concedida em 30 de Maio de 2000 a S. W. Liu et al.) utilizando iniciadores oligonucleotídicos contendo a extremidade 5' e 3' do gene FDH de *P. pastoris* juntamente com sítios de clivagem compatíveis para endonucleases de restrição:

5'TCGTCATGAAATCGTTCTCGTTTTG3' (extremidade 5'; sentido;
SEQ ID Nº: 1)

*Bsp*HI

5'TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT3' (extremidade 3'; anti-sentido;
SEQ ID Nº: 2)

*Bam*HI

A amplificação de alta fidelidade por PCR do gene FDH de *P. pastoris* foi realizada em quatro alíquotas de 100 µL, contendo cada tampão de reacção 1 X TaqPlus (Stratagene, LaJolla, CA), 0,2 mM de cada trifosfato de desoxinucleotido (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4 nM de cada oligonucleótido, 2,5 U de ADN polimerase TaqPlus (Stratagene) e 10 pg de ADN de plasmídeo contendo o gene FDH de *P. pastoris* clonado. As

condições de amplificação incluíram a incubação a 94 °C durante 4 minutos, seguida por 25 ciclos de incubação a 94 °C durante 1 minuto; 50 °C durante 1 minuto; e 72 °C durante 1,5 minutos, utilizando um termociclador Perkin-Elmer Modelo 480 com auto-extensão.

A mistura reaccional de PCR foi extraída com um volume igual de fenol:clorofórmio 1:1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) e centrifugada a 13000 x g durante 5 minutos. A fase aquosa superior foi removida e colocada num novo tubo de microcentrífuga. O ADN foi precipitado pela adição de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado. Após centrifugação a 13000 x g durante 5 minutos, o líquido foi aspirado do tubo e o sedimento foi lavado com 0,5 mL de etanol gelado a 70%. O líquido foi novamente aspirado e o sedimento foi deixado secar ao ar durante 30 minutos à temperatura ambiente.

O ADN amplificado foi digerido com 20 unidades de cada um de *Bsp*HI e *Bam*HI durante 3 horas a 37 °C num volume total de 50 µL. Em paralelo, o vector pBMS2000 (2 µg) foi digerido com *Bsp*HI e *Bam*HI. As amostras digeridas foram submetidas a electroforese em gel de agarose com 1,0% de TAE durante 2 horas a 100 v. As bandas correspondentes ao gene FDH (fragmento de 1100 pares de bases) e vector linearizado (fragmento de 4700 pares de bases) foram excisadas separadamente do gel e purificadas utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Chatsworth, CA). As concentrações dos fragmentos isolados foram estimadas por electroforese contra a escala de massas de baixo peso molecular (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) e ligados numa proporção molar de 5:1 (inserção:vector) num volume total de 10 µL a 22 °C durante 2 horas. O ADN foi precipitado por adição de 15 µL de

dH₂O e 250 µL de 1-butanol e sedimentado a 13000 x g numa microcentrífuga durante 5 minutos. O líquido foi removido por aspiração e o ADN foi seco num SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NI) durante 5 minutos sob calor fraco. O sedimento foi ressuspensão em 5 µL de dH₂O.

O ADN ressuspensão foi transformado por electroporação em 0,04 mL de células competentes de *E. coli* DH10B (Invitrogen) a 25 µF e 250 Ω. O meio SOC foi imediatamente adicionado (0,96 mL; SOC = 0,5% de extracto de levedura, 2% de triptona, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e 20 mM de glucose por litro) e as células incubadas num agitador durante 1 hora a 37 °C e 225 rpm. As colónias contendo o ADN de plasmídeo foram seleccionadas em placas de agar LB contendo 50 µg/mL de sulfato de canamicina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Os plasmídeos com a inserção pretendida foram identificados por PCR de colónia em tubos capilares, utilizando o RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Cada mistura reaccional continha Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), MgCl₂ 4 mM, 0,25 mg/mL de albumina de soro de bovino, 2% de sacarose 400, vermelho de cresol 0,1 mM, 0,4 nM de cada iniciador (SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2) e 2,5 U de Taq ADN polimerase (Promega Corp, Madison, WI). A mistura reaccional foi dividida em alíquotas de 10 µL e pipetada para os poços de uma placa de microtitulação de fundo redondo. Uma colónia resistente à canamicina foi retirada utilizando uma agulha de inoculação de plástico descartável, rodada para dentro da mistura reaccional, e transferida para agar LB-canamicina. Cada alíquota da mistura reaccional foi recolhida num tubo capilar de 30 µL e o tubo foi vedado à chama em ambas as extremidades. As células foram lisadas e o ADN desnaturado por incubação a 94 °C durante 30 segundos; a amplificação foi efectuada utilizando 30 ciclos de incubação a 94 °C durante 0 segundos; 40 °C durante

0 segundos e 72 °C durante 60 segundos, utilizando um termociclador RapidCycler (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT). As amostras foram submetidas a electroforese num gel de agarose com TAE a 1,0% durante 2 horas a 100 v. Sete amostras das 17 testadas mostraram uma banda forte a 1100 pares de bases. Uma colónia contendo este plasmídeo (aqui referida como pBMS2000-PPFDH) foi escolhida para o passo seguinte na construção do plasmídeo.

"PDHmod" refere-se a uma fenilalanina desidrogenase modificada de *Thermoactinomyces intermedius* que difere da sequência de ADN publicada (Takada *et al.*, *J. Biochem.* 109, páginas 371-376 [1991]) por uma alteração dos dois últimos aminoácidos e 12 aminoácidos adicionais no terminal carboxilo que é necessária para a conversão completa de ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético em ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético. Esta alteração foi introduzida no plasmídeo pPDH9K/10 (descrito em pormenor na patente WO 200004179, concedida a Donovan *et al.*, 27 de Janeiro de 2000), o qual foi subsequentemente transformado em SMD1168 de *P. pastoris* (depositado como estirpe ATCC 74408).

A extremidade 3' do gene de PDH nativo e correspondentes aminoácidos:

AAC	AGC	GCA	AGG	AGG	TAA
Asn	Ser	Ala	Arg	Arg	Stop

A extremidade 3' do gene de PDHmod e correspondentes aminoácidos (aminoácidos modificados ou novos em **negrito**):

AAC	AGC	GCG	GAG	GGG	TAC	CTC	GAG	CCG	CGG
Asn	Ser	Ala	Glu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Pro	Arg

CGG	CCG	CGA	ATT	AAT	TCG	CCT	TAG	SEQ ID Nº: 5	
Arg	Pro	Arg	Ile	Asn	Ser	Pro	Stop		

Foram preparados iniciadores oligonucleotídicos contendo a extremidade 5' e 3' do gene de PDHmod juntamente com sítios de clivagem compatíveis para endonucleases de restrição:

GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTGAAATGATG (extremidade 5'; sentido;
SEQ ID Nº: 3)

NdeI

GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTCG (extremidade 3'; anti-sentido;
SEQ ID Nº: 4)

SmaI

As condições reaccionais para amplificação e purificação da PDHmod por PCR foram idênticas às utilizadas para o gene de FDH de *P. pastoris* excepto que o ADN cromossómico preparado de ATCC 74408 foi incluído como molde para a reacção. O fragmento resultante foi digerido com 20 unidades, cada, de *NdeI* e *SmaI* durante 1 hora a 25 °C, seguido por 2 horas a 37 °C, num volume total de 50 µL. Em paralelo, uma versão do vector pBMS2000 com um sítio *NdeI* no codão de iniciação (2 µg) foi digerido com *NdeI* e *SmaI*, utilizando condições idênticas. As amostras digeridas foram submetidas a electroforese em separado sobre um gel de agarose em TAE a 1,0% durante 2 horas a 100 v. As bandas correspondentes ao gene de PDHmod (fragmento de 1200 pares de bases) e vector linearizado (fragmento de 4700 pares de bases)

foram excisadas do gel e purificadas utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). A ligação dos dois fragmentos, transformação de *E. coli* e rastreio de colónias contendo inserções com o gene de PDHmod (formando pBMS2000-PDHmod) foram realizados como descrito acima.

Para a construção de pBMS2000-PPFDH-PDHmod, clivou-se pBMS2000-PDHmod (2 µg) com 10 U cada de *Hind*III e *Sma*I numa reacção de 50 µL durante 1 hora a 25 °C, seguida de 1 hora a 37 °C. Adicionaram-se dez unidades de T4 ADN polimerase (Invitrogen) e 2 µL de uma mistura 2,5 mM de todos os quatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos e a amostra foi incubada a 11 °C durante 20 minutos. A reacção foi submetida a electroforese num gel de agarose com TAE a 1,0% durante 2 horas a 100 v. O fragmento de 1800 pares de bases foi excisado e isolado utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Este fragmento contém, por ordem, o promotor *tac*, o gene *groES* e o gene de PDHmod (como uma fusão transcricional). Em seguida, pBMS2000-PPFDH (2 µg) foi digerido com 10 unidades de endonuclease de restrição *Sma*I num volume de 50 µL durante 2 horas a 25 °C, depois foi tratado com 0,4 U de fosfatase alcalina de camarão (United States Biochemicals, Cleveland, OH) durante 1 hora a 37 °C. O ADN do plasmídeo foi submetido a electroforese durante 2 horas a 100 v num gel de agarose com TAE a 1,0%, isolado e extraído com o kit QIAquick. Os dois fragmentos foram ligados numa proporção molar de 6,5:1 (inserção:vector) a 16 °C durante 4 horas num volume final de 10 µL. Após extracção com 1-butanol e centrifugação, o ADN foi transformado em células DH10B electrocompetentes. As colónias resistentes a canamicina foram rastreadas quanto à presença do gene de PDHmod com os dois iniciadores específicos de PDHmod como descrito anteriormente para FDH. Um segundo ciclo de

rastreio por PCR foi conduzido utilizando iniciadores de ADN homólogos à extremidade 5' do PPFDH e extremidade 3' do gene de PDHmod, respectivamente. Só as construções capazes de suportar a amplificação de um fragmento de 1400 pares de bases possuíam os dois genes na mesma orientação. Foi encontrado um desses plasmídeos e a orientação confirmada por digestão de restrição diagnóstica com *KpnI*, o qual produziu os fragmentos esperados de 5422 e 1826 pares de bases. Este plasmídeo foi designado "pBMS2000-PPFDH-PDHmod".

EXEMPLO 8

Expressão de FDH e PDHmod

O pBMS2000-PPFDH-PDHmod foi transformado em *Escherichia coli* JM110. Em estudos em balões com agitação, o JM110 (pBMS2000-PPFDH-PDHmod) foi cultivado durante 18 horas a 28 °C, 250 rpm, em meio MT5 (Yeastamine a 2,0%, glicerol a 4,0%, fosfato de sódio [dibásico] a 0,6%, fosfato de potássio [monobásico] a 0,3%, sulfato de amónio a 0,125%, sulfato de magnésio a 0,0256% [hepta-hidrato; adicionado após autoclavagem de uma solução 1 M estéril] e 50 µg/mL de sulfato de canamicina [adicionado após autoclavagem de uma solução a 50 mg/mL esterilizada por filtração]). A densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) foi registada e células suficientes para produzir uma OD₆₀₀ inicial de 0,35 foram adicionadas a meio fresco de MT5/canamicina. Os balões foram agitados a 250 rpm, 28 °C até a OD₆₀₀ ser de 0,8-1,0. A expressão de ambos os genes foi induzida por adição de isopropiltio-β-D-galactopiranósido (IPTG) 1 M esterilizado por filtração até uma concentração final de 35 µM e a fermentação continuou durante 24-48 horas. As células foram

sedimentadas por centrifugação a 6500 x g durante 5 minutos, lavadas uma vez com um volume igual de formato de amónio 50 mM, pH 7,0, e ressedimentadas. As células foram armazenadas congeladas a -20 °C ou utilizadas imediatamente. O sedimento foi ressuspenso em fosfato de amónio 50 mM, pH 7,0 a 10 mL/g de peso de células húmidas e sonicadas 3 x 15 segundos utilizando um desmembrador sónico modelo 50 de Fisher Scientific (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), regulado para a potência 15 com uma microponeta. Os resíduos foram sedimentados por centrifugação a 13000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente.

A expressão foi examinada por electroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Um µL do extracto de células foi misturado com 5 µL de tampão 4X NuPAGE™ LDS (Invitrogen) e levado até 19 mL com água destilada. As amostras foram aquecidas a 70 °C durante 10 minutos. Um mL de uma solução de ditiotreitól 1 M foi adicionado à mistura e 10 µL aplicados num mini-gel de 10% de NuPAGE™ Bis-Tris poliacrilamida. A electroforese foi realizada a 200 v durante 50-60 minutos e o gel corado com uma solução consistindo em 0,1% (p/v) de Azul de Coomassie (Sigma), 40% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético. O gel, imerso no corante, foi aquecido num forno de microondas até a ebulição ser evidente, depois foi agitado a 40 rpm num agitador orbital durante 15 minutos. O gel foi completamente lavado com água desionizada e coberto com solução de descoloração (GelClear™; Invitrogen). A solução foi novamente aquecida até o ponto de ebulição e agitada suavemente durante, pelo menos, 2 horas. Duas bandas proeminentes a M_r 43000 e 40000 foram observadas por indução, correspondentes aos pesos moleculares esperados das subunidades FDH e PDHmod. Verificou-se que as amostras também tinham actividades de FDH e PDH quando testadas como descrito no

Exemplo 10. A esta estirpe de *E. coli* recombinante foi dada a designação interna de SC 16496.

A SC 16496 foi posteriormente fermentada em volumes de 15 e 250 litros. Para uma fermentação de 15 litros, um frasquinho contendo 1 mL de SC 16496 congelada foi descongelado até à temperatura ambiente e adicionado a 1 litro de meio MT5 contendo 50 µg/mL de canamicina num balão de 4 litros. O balão foi incubado a 28 °C, 250 rpm durante 24 horas e transferido para 13 litros de meio MT5 (ingredientes em lotes com base num volume final de 15 L) num fermentador Braun. O sulfato de canamicina e hepta-hidrato de sulfato de magnésio suficiente para produzir uma concentração final de 50 µg/mL e 0,0246%, respectivamente, foram dissolvidos em 500 mL de água destilada e esterilizados por filtração por meio de uma unidade de filtração de 0,2 micrómetros de acetato de celulose. A solução foi adicionada ao tanque, seguida imediatamente pelo inóculo. A OD₆₀₀ inicial foi cerca de 0,35.

Os parâmetros operatórios da fermentação foram como se segue:

Volume de trabalho de 16 litros

Temperatura: 28 °C

Aeração: 1,0 vvm

Pressão: 690 mbar

Agitação: 500 rpm

pH de controlo a 6,8 com NH₄OH consoante necessário

A formação de espuma foi controlada por adição de UCON (uma mistura de solventes de fluorocarbonetos produzida por Dow Chemical Company) a pedido.

A OD_{600} 0,8-1,0 (aproximadamente duas horas após a inoculação), IPTG esterilizado por filtração (dissolvido em 500 mL de dH_2O) foi adicionado assepticamente para produzir uma concentração final de 35 μM . A fermentação continuou durante mais 48 horas, pelo que o conteúdo do tanque foi sub-arrefecido a 10 °C. As células foram recolhidas por centrifugação e lavadas uma vez com 0,1 vol de formato de amónio 50 mM, pH 7,0. A pasta de células foi colocada em recipientes de plástico e armazenada a -70 °C até ser necessária.

Para tanques de 250 L, o inóculo foi preparado como se segue: 1 mL de SC 16496 congelado foi descongelado e adicionado a 300 mL de meio MT5 com 50 $\mu g/mL$ de canamicina. O balão foi cultivado a 28 °C, 250 rpm, durante 24 horas. A OD_{600} foi determinada e o volume apropriado de células para produzir 80 unidades OD foi removido e adicionado a 250 mL de meio MT5 fresco. As células foram adicionadas assepticamente a 10 L de meio MT5/canamicina num fermentador Braun (OD_{600} inicial ~0,008) e cultivadas com os Parâmetros Operacionais de Fermentação divulgados *supra* durante 16 horas. A cultura foi, então, transferida para 250 L de MT5 contendo as concentrações apropriadas de canamicina e sulfato de magnésio. Com base no tempo de duplicação de 90 minutos de SC 16496 nestas condições, 10 L de inóculo em 250 L deve produzir uma OD_{600} inicial de 0,30-0,35. A indução, crescimento, colheita e armazenagem foram realizadas como descrito para a fermentação de 15 L.

EXEMPLO 8A

Produção compactada de ácido (α S)- α -[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula VI) a partir de ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) através de ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V), utilizando um concentrado enzimático de PDH/FDH isolado

Passo 1: Isolamento de concentrado enzimático de PDH/FDH

O caldo de fermentação (30 litros) de *Escherichia coli* JM110 (pBMS2000-PPFDH-PDHmod) foi obtido a partir de um tanque de fermentação de 4000 L e passado através de um microfluidificador (Microfluidics modelo M-110Y, pressão operacional 12000-20000 psi) (uma passagem) para libertar a actividade das células, mantendo a temperatura do caldo de cultura inferior a 40°. A actividade de PDH/FDH do caldo microfluidificado era de 32 UI/mL para PDH e 8 UI/mL para FDH.

Para clarificar o caldo inteiro, adicionaram-se 4,5 kg de Celite ao caldo com boa agitação. Em seguida, adicionaram-se 0,201 litros de polietilenoimina aquosa a 30% e misturou-se durante 30 minutos. A mistura foi, então, filtrada utilizando um filtro-prensa (Ertel Alsop modelo 8- ESSC-10) e obtiveram-se 18 litros de filtrado. O bolo de filtrado foi lavado com 12 litros de água para levar o volume de volta aos 30 litros. O rendimento do passo foi de 97% de recuperação da actividade da PDH, com uma actividade de 31 UI/mL, e uma actividade de FDH de 8 UI/mL.

O caldo clarificado foi ultrafiltrado através de uma cassette de filtro MWCO 100000 (unidade Millipore Pellicon 2, cassette de ligação a proteínas com baixo teor de poliétersulfona, 0,5 m² de área do filtro). A velocidade de circulação da bomba era de 400 mL/min. O filtrado clarificado foi concentrado até 1,5 litros e produziu um concentrado enzimático com um título de PDH de 567 UI/mL e um título de FDH de 136 UI/mL. O permeado foi ensaiado e não foi encontrada nenhuma actividade. A recuperação total de actividade enzimática no concentrado foi de 84%.

Passo 2: Aminoação redutora

Adicionou-se ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) (1,00 kg; 4,46 mol) a um recipiente de 20 L, seguido por água (5 L). A mistura foi agitada e o pH foi ajustado para pH ~8 com NaOH 10 N para produzir uma solução. Adicionou-se carvão Darco KBB (100 g) e a mistura foi agitada durante 5 minutos e, depois, filtrada através de um funil de Buchner com papel de filtro de 5 μ L. O filtro foi lavado com água (2 x 1 L) e os filtrados e as lavagens foram combinados para produzir uma solução límpida.

Com agitação, adicionou-se formato de amónio (0,562 kg; 8,92 mol) e o pH foi reajustado para ~7,5 com NaOH 10 N. Adicionou-se nicotinamida adenina dinucleótido (2,65 g) e ditiotreitol (1,54 g). Quando os sólidos se tinham dissolvido, adicionou-se um concentrado de enzimas PDH/FDH (1,03 L; 500000 UI de PDH). O pH foi reajustado para ~8,0 com NaOH 10 N à temperatura ambiente.

A mistura foi, então, aquecida a ~40 °C e diluída para um volume total de 10 L com água. O pH foi mantido a 7,7-8,3 enquanto se agitou durante 42 horas. A solução resultante continha 0,955 kg (95,1%) do produto ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V).

Passo 3: Protecção com BOC

Adicionou-se dicarbonato de di-terc-butilo (1,022 kg; 4,68 mol) a uma porção da solução de ácido (α S)- α -amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) (477,5 g, 2,12 mol). Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente com o pH ajustado e mantido a 10 com um titulador de pH estacionário utilizando NaOH 10 N. A reacção estava completa 4 horas após a adição de BOC₂O quando havia menos de 1,0% de material de partida remanescente.

O pH da mistura foi ajustado para ~8 com H₂SO₄ a 35% e adicionou-se i-PrOAc (5,0 L) à mistura. O pH da mistura foi, então, ajustado para 2,0 com H₂SO₄ a 35% e mantida a este pH durante 5-10 min. Adicionou-se Dicalite (250 g); a mistura foi agitada durante ~10 min e, depois, filtrada através de uma camada de Dicalite (250 g) em papel de filtro num funil de Buchner. A camada de Dicalite foi ainda lavada com 2,5 L de i-PrOAc.

O filtrado foi ajustado para pH 8 com NaOH 10 N. Após deposição durante 1 h, a camada orgânica incluindo a interface foi desprezada. À camada aquosa adicionou-se i-PrOAc (7,5 L). A mistura foi acidificada com H₂SO₄ a 35% até pH ~2 e, depois, foi aquecida e mantida a ~40 °C durante 4 horas com agitação suave.

As camadas foram separadas e o extracto orgânico foi armazenado. A camada aquosa com interface foi extraída com i-PrOAc (3,75 L) e as camadas foram novamente separadas após 2 h a 40 °C. A camada aquosa com interface foi novamente extraída com i-PrOAc (3,75 L) e as camadas foram separadas após 2 h a 40 °C.

Os extractos orgânicos combinados (~15 L) foram concentrados por destilação até ~4,5 L. A esta solução adicionou-se, então, heptano (~10 L) durante 10-15 min enquanto a temperatura era mantida a ~82-89 °C. A temperatura da camisa do reactor foi regulada para 70 °C e mantida a esta temperatura durante 1 h. A cristalização ocorreu logo após o arrefecimento. A temperatura da camisa do reactor foi, em seguida, ajustada para 40 °C e mantida a esta temperatura durante 30 min.

A suspensão foi arrefecida até à temperatura ambiente e, depois, adicionalmente arrefecida a 0-5 °C. Após uma hora de agitação a 0-5 °C, o produto foi filtrado. O produto foi lavado com heptano (2,5 L), depois, seco em vácuo a 40 °C para produzir 607,0 g (88% de rendimento) de ácido (αS)-α-[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxi-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI).

EXEMPLO 9

Aminação redutora utilizando um extracto de *Escherichia coli* recombinante SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (depósito ATCC PTA-4520)

Células congeladas de *Escherichia coli* recombinante (25 gramas) foram adicionadas a água desionizada (suficiente

para levar o volume final a 100 mL e contendo 5 mL de formato de amônio 1 M). Após descongelação, as células foram suspensas utilizando um homogeneizador Janke and Kunkel Ultra-turrax T8, em seguida, foram ajustadas para pH 7 com NH₄OH concentrado e arrefecidas com gelo picado para produzir uma suspensão de células a 25% p/v em formato de amônio 50 mM. As células foram rompidas por 2 passagens através de um microfluidificador a 12000 psi e os detritos das células foram removidos por centrifugação a 20000 x g e 4 °C. Adicionaram-se 266 mL de sobrenadante contendo 2456 u (ensaio A) ou 768 u (ensaio C) de fenilalanina desidrogenase e 8801 u de formato desidrogenase a um frasco de 1 L.

Foram preparados 266 mL de solução contendo formato de amônio (16,74 g, 0,2654 moles) e ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético (29,76 g, 0,1327 moles) e levados a pH 8,0 com 12,7 mL de hidróxido de amônio concentrado. Adicionou-se então NAD (372 mg, 0,561 mmol) e ditiotreitól (81,8 mg, 0,530 mmol), depois, a solução foi adicionada ao frasco contendo o extracto de *Escherichia coli*. O frasco foi mantido a 40° num agitador a 40 rpm. Adicionou-se periodicamente hidróxido de amônio concentrado para manter o pH 8,0. Após 38 horas, a solução continha 31,5 gramas (0,140 moles, 100% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético como determinado por análise de HPLC e nenhum enantiómero R do aminoácido.

EXEMPLO 10

Aminação redutora utilizando células liofilizadas de *Escherichia coli* recombinante SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (Depósito ATCC PTA-4520)

A solução continha num volume final de 10,0 mL a pH 8,0 (pH ajustado com NH₄OH): formato de amônio 0,50 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,237 M, NAD 1,00 mM, ditioneitol 1,00 mM e 975 mg de *Escherichia coli* recombinante liofilizada. As células foram secas até 26% do peso húmido. Antes da secagem as células continham 65,04 unidades/g (ensaio A) de fenilalanina desidrogenase (ou 12,79 unidade/g pelo ensaio C de fenilalanina desidrogenase) e 133,32 unidades/g de formato desidrogenase. A solução foi incubada num balão de Erlenmeyer de 50 mL hermeticamente fechado a 40 °C, 100 rpm, durante 3 dias, depois foi analisada por HPLC. A solução continha 49,06 mg/mL (92,13,0% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético.

EXEMPLO 11

Transaminação utilizando transaminase de cadeia ramificada

Foi preparada uma solução contendo num volume final de 1,0 mL em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 8,0: glutamato de sódio 0,10 M, ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético 0,05 M (neutralizado com NaOH 0,05 M), fosfato de piridoxal 0,1 mM e 1 mg de transaminase de cadeia ramificada (Biocatalytics). A solução foi incubada num tubo de microcentrífuga a 37° durante 68 horas, depois foi analisada por

HPLC. A solução continha 5,53 mg/mL (49,2% de rendimento) de ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético e 7,05 mg/mL de ácido (3-hidroxi-adamantan-1-il)-oxo-acético remanescente.

EXEMPLO 12

Ensaio HPLC do excesso enantiomérico e quantidade do ácido (S)-amino-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético

As amostras foram diluídas com água até à concentração de cerca de 2 mg/mL e colocadas num banho de água em ebulição durante 1 minuto para parar as reacções e precipitar as proteínas. Após arrefecimento, as amostras foram filtradas através de filtros de nylon de 0,2 micrones para frasquinhos de HPLC.

Foram utilizados dois métodos de separação.

Método 1:

coluna: Chiralpak WH 25 x 0,46 cm (Daicel Industries, Ltd.).

fase móvel: CuSO₄ 0,3 mM

caudal: 1 mL/minuto

temperatura da coluna: 50 °C

detecção: detector de díodos (DAD) regulado para 240 nm

volume de injeção: 10 µL

tempo de retenção do enantiómero S (ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético): 79,9 minutos

tempo de retenção do enantiómero R: 32,8 minutos

Método 2:

coluna: Regis Davankov Ligand Exchange 15 x 0,46 cm

fase móvel: 25% de metanol/75% de CuSO₄ 6 mM

caudal: 1 mL/minuto

temperatura da coluna: 40 °C

deteção: DAD regulado para 240 nm

volume de injeção: 10 µL

tempo de retenção do enantiómero S (ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético): 3,2 minutos

tempo de retenção do enantiómero R: 11,2 minutos

tempo de retenção do cetoácido (ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético): 5,2 minutos

EXEMPLO 13

Ensaio A de fenilalanina desidrogenase

O ensaio A de fenilalanina desidrogenase continha em 1 mL a 40 °C: NADH 0,4 mM, fenilpiruvato de sódio 5 mM, NH₄OH 0,75 M ajustado para pH 8,75 com HCl. O decréscimo da absorvância foi monitorizado a 340 nm. As unidades de actividade enzimática foram calculadas como µmol/minuto com base nas velocidades de mudança de absorvância.

EXEMPLO 14

Ensaio B de fenilalanina desidrogenase

O ensaio B de fenilalanina desidrogenase continha em 1 mL a 40 °C: NAD 1 mM, L-fenilalanina 10 mM, K_2HPO_4 0,1 M ajustado para pH 10,0 com NaOH 1 N. O aumento de absorvância foi monitorizado a 340 nm. As unidades de actividade enzimática foram calculadas como $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ com base nas velocidades de mudança de absorvância.

EXEMPLO 15

Ensaio C de fenilalanina desidrogenase

O ensaio C de fenilalanina desidrogenase continha em 1 mL a 40 °C: NADH 0,4 mM, ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético 50 mM (dissolvido em 1 equivalente de solução de NaOH), NH_4OH 0,75 M ajustado para pH 8,75 com HCl. O decréscimo da absorvância foi monitorizado a 340 nm. As unidades de actividade enzimática foram calculadas como $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ com base nas velocidades de mudança de absorvância.

EXEMPLO 16

Ensaio de formato desidrogenase

O ensaio de formato desidrogenase continha em 1,0 mL a 40 °C: NAD 1 mM, formato de amónio 100 mM, tampão fosfato de

potássio 100 mM, pH 8,0. O aumento da absorvância foi monitorizado a 340 nm. As unidades de actividade enzimática foram calculadas como $\mu\text{mol/minuto}$ com base nas velocidades de mudança de absorvância.

EXEMPLO 17

Bromação de ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) a ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético (Fórmula O)

O ácido triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula N) sólido (288 gramas; 1,48 moles) foi suspenso em cloreto de tionilo (465 mL) num balão de fundo redondo com 3 tubuladuras, equipado com um condensador. Adicionou-se dimetilformamida (DMF, 0,3 mL) e a suspensão foi agitada, à temperatura ambiente, durante 1,5 horas. A conclusão da reacção foi verificada por cromatografia gasosa. Adicionou-se, então, NBS sólida (307 g), em porções, à mistura reaccional e a mistura reaccional foi aquecida a 60 °C. A reacção foi agitada durante 3 horas enquanto se mantinha a temperatura a 60 a 65 °C. Efectuou-se a monitorização por cromatografia gasosa para assegurar a conclusão da reacção. Adicionou-se heptano (900 mL) à mistura reaccional. O excesso de cloreto de tionilo foi removido por destilação a 78-80 °C. Adicionou-se, então, água, cuidadosamente, (reacção violenta) para desactivar a reacção (volume total de 1050 mL). Adicionou-se, então, heptano (500 mL) e água (600 mL) e a camada aquosa foi separada da camada orgânica. A camada orgânica foi lavada com mais água (600 mL) e a camada aquosa foi novamente separada da camada orgânica. Adicionou-se mais água (150 mL) à camada orgânica de heptano e o

heptano foi removido por destilação da camada aquosa. Especificamente, 70 mL de água co-destilaram com heptano. Após a remoção do heptano por destilação, adicionou-se tetra-hidrofurano (THF; 1200 mL) à camada aquosa e a mistura resultante foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente durante 16 horas para hidrólise lenta. A monitorização por meio de cromatografia gasosa indicou a presença de algum cloreto ácido que não reagiu. Adicionou-se então mais água (150 mL) para acelerar a hidrólise e a reacção foi monitorizada por cromatografia gasosa para assegurar que estava completa. O THF foi, em seguida, removido por destilação produzindo uma mistura reaccional bifásica (água e óleo). Adicionaram-se então núcleos e deixou-se a reacção atingir a temperatura ambiente para que se separasse um sólido pesado. Adicionou-se água (250 mL) e acetonitrilo (500 mL) para manter a suspensão agitada enquanto a suspensão foi agitada durante 2 horas, à temperatura ambiente. O sólido foi, então, separado por filtração e lavado com acetonitrilo (2 x 250 mL). Este filtrado continha a primeira colheita de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula 0); 264 gramas com AP 95 com 66% de rendimento após secagem em vácuo à temperatura ambiente. O resíduo das águas-mães (113 gramas de resíduo) foi, então, triturado com água e acetonitrilo (250 mL/250 mL) durante 1-2 horas à temperatura ambiente. A reacção foi, então, filtrada e o sólido seco para se obter uma segunda colheita de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula 0); 64 gramas, com AP 90 em 16% de rendimento.

EXEMPLO 18

Preparação de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) a partir de ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O)

Um balão de Erlen-Meyer foi carregado com 315 mL de H₂SO₄ a 95-98% e depois arrefecido a 8 °C num banho de gelo. Adicionou-se, então, HNO₃ (35 mL de 50% preparados por adição de 50 mL de HNO₃ a 70% a 30 mL de água) ao balão enquanto se mantinha a mistura num banho de gelo a 8 °C. Adicionou-se então ácido α -bromotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula O) sólido (92 gramas, 0,338 moles) à mistura em porções ao longo de, aproximadamente, 30 a 60 minutos de modo a manter a temperatura abaixo de 28 °C. A reacção foi, depois, agitada enquanto se aquecia a 60 °C até se obter uma solução límpida.

O progresso da reacção foi monitorizado por cromatografia em camada fina (TLC) ou cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A TLC foi realizada com um sílica gel utilizando acetato de etilo/metanol/hexanos numa proporção de 9:1:10 com KMnO₄. A HPLC foi realizada utilizando uma coluna de ODS, C18 S-3 120A, 4,6 x 50 mm, um gradiente linear de 10% de acetonitrilo/H₂O até 100% de acetonitrilo em 7 minutos e um caudal de 2,5 mL/minuto. O comprimento de onda de detecção foi 220 nm.

Quando a reacção estava completa, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e assim mantida durante, aproximadamente, 16 horas. Adicionou-se então água (700 mL) para desactivar a reacção até não haver gases castanhos emitidos. A suspensão resultante foi arrefecida num banho de gelo até aproximadamente 5 °C e depois filtrada. O filtrado sólido foi

lavado com 200 mL de água e seco ao ar para produzir 90 gramas de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q) como um sólido amarelo claro (rendimento de 92%)

EXEMPLO 19

Preparação de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula (V) a partir de ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula Q)

Dissolveu-se ácido α -bromo-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Formula Q) (75 gramas, 0,278 moles) em 225 mL de hidróxido de amónio a 30% (4,08 mol, 14,6 equivalentes). A mistura reaccional foi, então, aquecida a 65 °C durante 16 horas. A mistura reaccional foi, depois, concentrada num evaporador rotativo até um sólido. Adicionou-se EtOH (200 mL) ao sólido e reconcentrou-se então no evaporador rotativo. O rendimento foi de 71 gramas de uma mistura quiral de ácido hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula (V) como um sólido amarelo (90%).

EXEMPLO 20

Resolução de ácido hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula (V)

Efectuou-se a protecção com Boc da mistura quiral do Exemplo 19 utilizando anidrido Boc e hidróxido de sódio em tetra-hidrofurano. O composto resultante ácido α -[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-]3]hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]

decano-1-acético (Composto R) (0,25 M em EA, 80 µL, = 6,52 mg) foi misturado com base quiral ([1R,2S]-(-)-1,2-difenil-hidroxietilamina) (0,25 M, 80 µL) num frasquinho e a mistura foi evaporada até à secura no SpeedVac. Adicionou-se solvente (200 µL). O frasquinho contendo a mistura foi colocado num agitador com aquecimento a 50 °C durante 1,5 horas. A mistura foi, então, arrefecida até à temperatura ambiente para cristalização do ácido (αS)-α-[[dimetiletoxi]carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Composto S).

EXEMPLO 21

Acoplamento com brometo de adamantilo catalisado por ZnCl₂ (Fórmula A)

Um recipiente seco foi carregado com 7,5 kg de brometo de adamantilo. Adicionou-se então cloreto de metileno (22,5 litros) à temperatura ambiente, para dissolver o brometo de adamantano sólido. A dissolução é endotérmica, por isso, antes da fase seguinte, a temperatura da mistura reaccional foi deixada voltar aos 20 °C. A mistura reaccional foi, então, carregada com cloreto de zinco (1,05 kg) e agitada durante, aproximadamente, 5 minutos a 20 °C. A mistura reaccional foi, então, carregada com tris(trimetilsiloxi)-etileno (15,3 kg) enquanto se mantinha a temperatura da reacção entre 20 e 25 °C e a mistura resultante foi agitada durante 2 horas. Após esta mistura, adicionou-se tris(trimetilsiloxi)-etileno (5,10 kg). Durante esta adição, a temperatura foi mantida abaixo de 30 °C. A reacção foi mantida durante mais 12 a 15 horas a 20 °C a 25 °C, altura em que a mistura reaccional foi diluída com cloreto de metileno (15 litros) e arrefecida a 0 a 5 °C. A mistura reaccional foi

depois tratada, começando por modelo, gota a gota, com uma solução semi-saturada de NH_4Cl . Durante a adição, a temperatura foi mantida abaixo de $30\text{ }^\circ\text{C}$. Obteve-se uma suspensão espessa. A esta suspensão adicionou-se acetato de etilo (93,75 litros). A mistura foi agitada vigorosamente durante 15 minutos e as fases orgânica e aquosa foram separadas. A camada orgânica foi armazenada e a camada aquosa foi lavada duas vezes com acetato de etilo (18,75 litros em cada lavagem). As lavagens de acetato de etilo e a camada orgânica foram então combinadas e lavadas com água (37,5 litros) seguida por água semi-saturada com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (37,5 litros). A camada orgânica foi separada novamente e evaporada para formar cristais. Foi, então, realizada uma permuta de solvente para heptano num volume final de 22,5 litros. A suspensão resultante foi arrefecida a 5 a $10\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora e o produto ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) foi obtido por meio de filtração. O rendimento de ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) foi de 6,96 kg (33,11 mol, 95%).

EXEMPLO 21A

Esterificação do ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B)

Foi primeiro criada uma atmosfera inerte no reactor. O reactor foi, então, carregado com metanol (35,00 litros), seguido por ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula B) (14,00 kg) para formar uma suspensão. A suspensão foi arrefecida a 0 a $5\text{ }^\circ\text{C}$ e adicionou-se cloreto de acetilo de tal modo que a temperatura da mistura reaccional foi mantida

entre 5 e 10 °C. Depois de completada a adição de cloreto de acetilo, a mistura reaccional foi aquecida a 20 a 25 °C e agitada durante 2 horas a 20 a 25 °C. A mistura reaccional foi, então, concentrada em vácuo a 40 °C e obteve-se um óleo fino. O óleo foi dissolvido em acetato de etilo (71,96 litros) e levado até à temperatura ambiente. A mistura resultante foi lavada duas vezes com água (28,78 litros em cada lavagem) e as camadas orgânica e aquosa foram separadas após cada lavagem. A camada orgânica foi armazenada enquanto as camadas aquosas foram combinadas e ajustadas para pH 9,5 com solução de NaOH 3 N. As camadas aquosas combinadas foram depois extraídas duas vezes com acetato de etilo (14,39 litros em cada extracção). As camadas orgânicas depois de cada extracção foram separadas e combinadas com a camada orgânica armazenada. Estas fases orgânicas combinadas foram então lavadas com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (28,78 litros), seguida por solução aquosa saturada de cloreto de sódio (43,18 litros). Todos os voláteis foram então removidos em vácuo a 40 °C e obteve-se um óleo incolor a ligeiramente amarelo que cristalizou em repouso. Este óleo continha 13,29 kg (59,26 mol, 89%) de éster metílico do ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula C).

EXEMPLO 22

Oxidação de Swern de éster metílico do ácido <a-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula C)

Um balão de três tubuladuras (22 litros) foi equipado com um agitador mecânico, sonda de temperatura e uma ampola de adição e purgado com azoto, de um dia para o outro. Adicionou-se então cloreto de oxalilo (500 mL, 5,73 mol), seguido por CH₂Cl₂

(8 litros). A solução resultante foi arrefecida a $-69\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um banho de acetona/gelo seco. Adicionou-se então uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO; 700 mL, 9,86 mol) lentamente ao longo de aproximadamente 30 minutos, enquanto se mantinha a temperatura interna abaixo de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução foi agitada durante 20 minutos enquanto se mantinha a temperatura a -60 a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionou-se então uma solução de éster metílico do ácido α -hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula C) (990 g, 4,42 mol) em CH_2Cl_2 (1,7 litros) lentamente ao longo de aproximadamente 30 minutos enquanto se mantinha a temperatura interna abaixo de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução resultante foi agitada durante 30 minutos. Adicionou-se então NEt_3 (3 litros, 21,5 mol) para formar uma suspensão pesada de sal cloridrato de trietilamina. A mistura reaccional foi aquecida até à temperatura ambiente e adicionou-se água (1 litro) para dissolver o sal de trietilamónio (sal de TEA). A mistura reaccional foi, então, transferida para um balão de fundo redondo e concentrada para remover o diclorometano (DCM) e NEt_3 . Adicionou-se EtOAc (12 litros) e as camadas aquosa e orgânica resultantes foram separadas. A camada orgânica foi lavada três vezes com água (2 litros em cada lavagem), seguida por uma lavagem com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (2 litros). A fase orgânica foi, então, seca sobre Na_2SO_4 anidro com evaporação para produzir um sólido ligeiramente amarelo de éster metílico do ácido α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula D). O rendimento foi de, aproximadamente, 104%.

EXEMPLO 23

Hidroxilação de éster metílico do ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]-decano-1-acético, (Fórmula D) a éster metílico do ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula I)

Um balão de Erlenmeyer foi carregado com H₂SO₄ 95 a 98% (495 mL) e arrefecido num banho de gelo para 8 °C. Adicionou-se então HNO₃ (47,5 mL a 50% preparados por adição de 50 mL de HNO₃ a 70% a 30 mL de água) ao balão e a mistura foi novamente arrefecida para 8 °C no banho de gelo. Adicionou-se lentamente éster metílico do ácido <a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula D) sólido (100 gramas, 0,45 moles) à mistura em porções ao longo de 30 a 60 minutos para manter uma temperatura inferior a 28 °C. A mistura reaccional foi agitada enquanto se arrefecia no banho de gelo. O progresso da reacção foi monitorizado por cromatografia de camada fina (TLC) ou por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Para a TLC, utilizou-se sílica gel e o solvente foi EtOAc/MeOH/hexano (9/1/10); KMnO₄. Para HPLC, utilizou-se uma coluna C18 de 4,6 x 50 mm, 3 mícrones, 120 angstrom com um gradiente de 10% de acetonitrilo/H₂O até 100% de acetonitrilo em 7 minutos com um caudal de 2,5 mL/minuto. O comprimento de onda de monitorização foi de 200 nm. Quando a reacção estava completa (após, aproximadamente, 1 hora), a reacção foi desactivada por adição de água fria (1,5 litros) e EtOAc (500 mL). Adicionou-se mais água e EtOAc (500 mL em cada) para ajudar na separação das camadas aquosa e orgânica. A camada aquosa foi, então, extraída com 3 alíquotas, 500 mL cada, de EtOAc. As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (400 mL). A camada orgânica lavada foi, então,

concentrada a pressão reduzida para 130 gramas de um resíduo de óleo amarelo contendo éster metílico do ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula I).

EXEMPLO 24

Hidrólise de éster metílico do ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula I) a ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)

O resíduo de óleo amarelo do Exemplo 23 foi dissolvido em tetra-hidrofurano (300 mL) e arrefecido num banho de gelo a 5 °C. Adicionou-se lentamente um litro de hidróxido de sódio 1 N à solução para ajustar o pH a, aproximadamente, 7, enquanto se mantinha a temperatura abaixo de 30 °C. Adicionaram-se então mais 500 mL de NaOH 1 N para ajustar o pH para, aproximadamente, 14. A mistura reaccional foi, então, agitada enquanto era arrefecida num banho de gelo e o progresso foi monitorizado por TLC ou HPLC como descrito no Exemplo 23. Quando a reacção estava completa após, aproximadamente, 30 minutos, adicionou-se EtOAc (500 mL) e as camadas aquosa e orgânica foram separadas. A camada aquosa foi lavada com mais 500 mL de EtOAc. A camada aquosa foi acidificada com HCl concentrado. Quando a solução atingiu pH 7, adicionou-se EtOAc (500 mL) seguido por mais HCl concentrado até o pH atingir 0,7. O HCl concentrado total adicionado foi de 150 mL. A camada aquosa foi, então, extraída com EtOAc (4 x 400 mL) e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com 400 mL de água seguida por 400 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A camada orgânica lavada foi, então, seca com MgSO₄ e concentrada. O rendimento foi 88 gramas de um sólido amarelo claro. A dissolução deste sólido em 100 mL

de EtOAc e 300 mL de heptano com agitação durante 30 minutos, seguida por filtração e secagem ao ar produziu 85 gramas de um sólido castanho dourado (85% de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)).

EXEMPLO 25

Preparação de éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII)

Um balão de 2 litros com três tubuladuras equipado com um agitador mecânico, termómetro, condensador, ampola de adição de equalização de pressão e uma entrada de árgon foi carregado com pó de zinco (78,0 g, 1,19 mol) seguido pela adição de tetra-hidrofurano anidro (400 mL). A esta mistura adicionou-se 1,2-dibromoetano (2 mL) para activar o zinco. A mistura resultante foi aquecida a refluxo suave durante 25 minutos. Após arrefecimento a -55 °C, adicionou-se uma solução de tricloroacetato de metilo (100,3 g, 0,565 mol) e clorotrimetilsilano (80 mL, 0,648 mol) a uma velocidade para manter a temperatura da reacção a -55 a -60 °C (necessária 1 hora). Depois de completada a adição, a mistura foi deixada com agitação à temperatura ambiente durante, aproximadamente, 90 minutos. A mistura resultante foi diluída com heptano (700 mL) e filtrada sob azoto através de uma camada de Celite 545. O bolo de filtração foi lavado com heptano adicional (1 x 300 mL, 3 x 200 mL). O filtrado foi, então, concentrado a pressão reduzida num evaporador rotativo (aproximadamente 10-15 mm de Hg com um banho de água a 22-27 °C) para produzir (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano em bruto como um óleo denso (129,2 g). A RMN de prótons quantitativa indica que

este material em bruto contém 0,389 mol (68,8%) de (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano.

Um balão de 1 litro equipado com uma entrada de árgon foi carregado com (2,2-dicloro-1-metoxi-viniloxi)-trimetilsilano em bruto (129,1 g, aproximadamente 0,389 mol) e diclorometano anidro (100 mL). À solução resultante adicionou-se 1-bromoadamantano (75,2 g, 0,349 mol) e cloreto de zinco anidro (6,56 g, 48 mmol). A mistura resultante foi deixada com agitação à temperatura ambiente, de um dia para o outro. A mistura vermelha acastanhada resultante foi diluída com heptano (600 mL) e água (300 mL). A camada orgânica foi separada e lavada com água (2 x 200 mL), bicarbonato de sódio 1 N (3 x 150 mL) e água (2 x 200 mL). A solução resultante foi filtrada através de uma camada de Celite 545 e o filtrado foi concentrado a pressão reduzida para produzir um sólido incolor. Este material foi dissolvido em metanol em ebulição (250 mL). A solução resultante foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente durante 1 hora. Após arrefecimento a, aproximadamente, 5 °C durante 2 horas, o sólido foi recolhido por filtração e lavado com metanol:água frios (94:6, 4 x 50 mL) para produzir éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético (Fórmula VII) como um sólido incolor: 75,0 g (77,3% com base em 1-bromoadamantano); p.f. 76,3 °C.

Análise elementar: $C_{13}H_{18}Cl_2O_2$:

Calculada: C, 56,33; H, 6,55; Cl, 25,58%

Determinada: C, 56,49; H, 6,59; Cl, 25,72%

RMN de 1H (500,16 MHz, $CDCl_3$) δ 3,855 (s, 3H), 2,069 (s largo, 3H), 1,866 (d, J = 2,75 Hz, 6H), 1,683, 1,612 (AB q, J=12,1 Hz) ppm

RMN de ^{13}C (127,78 MHz, CDCl_3) δ 166,130, 95,805, 53,969, 43,980, 36,842, 36,256, 28,309 ppm

EXEMPLO 26

Preparação de éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII)

Preparação de HNO_3 10 N: Um balão volumétrico de 100 mL foi carregado com HNO_3 concentrado (88,25 g, ~62,58 mL, ~1,0 mole) e arrefecido num banho de gelo. Adicionou-se água (35 mL). Depois do calor da mistura se ter dissipado, a solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente. O balão foi, então, completado ao traço com água para obter HNO_3 10 N.

Um balão de 250 mL com três tubuladuras equipado com um termómetro termopar foi carregado com H_2SO_4 concentrado (103 g, ~56 mL). Após arrefecimento para $0,4\text{ }^\circ\text{C}$ num banho de gelo, adicionou-se HNO_3 10 N (5,68 mL, 56,8 mmol) ao longo de ~30 minutos. Quando a temperatura desta mistura de ácido tinha baixado para $\sim 1,0\text{ }^\circ\text{C}$, retirou-se o banho frio. Adicionou-se éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético de fórmula VII (15,0 g, 54,11 mmol; moído levemente em almofariz/pilão para desagregar os pedaços/cristais grandes) em porções (1,25 g a cada 10 minutos; 1 h 50 minutos de tempo de adição). Após ~5 horas, a mistura reaccional era uma solução amarela pálida límpida.

Após agitação durante ~24 horas, a mistura reaccional era uma solução amarela muito pálida. Um balão de Morton com quatro tubuladuras (1 L) equipado com um agitador mecânico e um

termómetro termopar foi carregado com água (250 mL) e ureia (8,0 g, 0,133 mol, ~2,34 equivalentes em relação a HNO_3). À solução resultante, adicionou-se acetato de etilo (230 mL). A mistura bifásica resultante foi arrefecida para ~1,0 °C num banho de gelo. A mistura reaccional anterior foi adicionada, ao longo de ~15 minutos, à mistura fria de EtOAc/água/ureia. A transferência foi completada utilizando acetato de etilo adicional e água (~50 mL de cada). Após agitação durante ~45 minutos, o banho frio foi removido e a mistura foi deixada aquecer com agitação. Após agitação durante 4,5 horas (desde o início da desactivação), a mistura resultante foi transferida para uma ampola de separação (1 L) utilizando acetato de etilo adicional (~100 mL) para completar a transferência. A fracção aquosa foi removida e extraída com acetato de etilo (1 x 80 mL). As fracções orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2 x 90 mL), NaHCO_3 1 N (4 x 90 mL) e solução aquosa saturada de cloreto de sódio. Após secagem sobre sulfato de magnésio anidro, o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula VIII como um sólido praticamente incolor: 15,67 g (98,7% de rendimento em bruto). Este material em bruto pode ser utilizado para preparar ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético de Fórmula IX sem purificação. Se desejado, no entanto, o material em bruto (15,65 g) pode ser recristalizado a partir de metanol (102 mL) e água (85 mL) para se obter um sólido fofo semelhante a algodão (p.f. 114,8-115,0 °C) com 91% de recuperação.

Análise elementar: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{O}_3$:

Calculada: C, 53,25; H, 6,18; Cl, 24,18%

Determinada: C, 53,24; H, 6,24; Cl, 24,31%

RMN de ^1H (500,16 MHz, CDCl_3) δ 3,857 (s, 3H), 2,298 (m largo, 2H), 1,824 (s, 2H), 1,793 (d, 4H, = 2,75 Hz), 1,682, 1,629 (br AB q, 4H), 1,529 (m, 3H)
ppm

RMN de ^{13}C (127,78 MHz, CDCl_3) δ 165,929, 94,281, 68,932, 54,150, 44,478, 44,529, 44,020, 35,750, 34,759, 30,149 ppm

Laboratório de HPLC:

YMC S3 ODS-A 120 Å (4,6 x 50 mm), λ = 200 nm, 2,5 mL/minuto

Solventes: A = H_3PO_4 a 0,2% em água

B = CH_3CN a 90% em água

Gradiente: 20% de A a 100% de B durante 10 minutos

Tempo de retenção	% de Área	Identidade
2,06 minutos	1,19	desconhecido
4,54 minutos	98,16	éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético
5,09 minutos	0,65	desconhecido
8,35 minutos		éster metílico do ácido adamantan-1-il-dicloro-acético

EXEMPLO 27

Preparação de ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX)

Um balão de 500 mL de fundo redondo foi carregado com metanol (200 mL) e NaOH 1 N (194 mL, 194 mmol,

aproximadamente 1,36 equivalentes em relação à quantidade de éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII)). A solução resultante foi arrefecida num banho de gelo até a temperatura ser $<9^{\circ}\text{C}$. O banho frio foi removido e adicionou-se éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula VIII) (41,68 g, 142,1 mmol). A suspensão resultante foi deixada com agitação à temperatura ambiente sob argon. Após agitação durante aproximadamente 6 horas, utilizou-se uma porção adicional de metanol (10 mL) para lavar as paredes do recipiente. Após agitação durante aproximadamente 17 horas, a mistura reaccional foi filtrada para remover uma pequena quantidade de material em partículas. A solução resultante foi transferida para um balão de 2 litros com três tubuladuras equipado com um agitador mecânico. Utilizou-se água (900 mL) para diluir a mistura reaccional e para completar a transferência. A solução resultante foi acidificada pela adição de HCl concentrado (38 mL, aproximadamente, 456 mmol). Rapidamente formou-se um sólido branco. A mistura foi agitada suavemente durante, aproximadamente, 20 minutos e depois colocada num banho de gelo. Após agitação suave durante, aproximadamente, 90 minutos, o agitador foi parado e a mistura foi deixada em repouso no banho de gelo durante mais 2 horas. A suspensão resultante foi filtrada e o bolo de filtração foi lavado com água gelada. A maior parte da água foi removida do sólido fazendo passar ar através do bolo de filtração. O material foi, então, seco em vácuo à temperatura ambiente durante 22 horas para produzir ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX) como um sólido pulverulento incolor: 39,19 g (98,7% de rendimento); p.f. 238°C (dec).

Análise elementar: C₁₂H₁₆Cl₂O₃:

Calculada: C, 51,63; H, 5,77; Cl, 25,40%

Determinada: C, 51,43; H, 5,74; Cl, 25,48%

Laboratório de HPLC:

YMC S3 ODS-A 120 Å (4,6 x 50 mm), λ 200 nm, 2,5 mL/minuto

Solventes A = H₃PO₄ a 0,2% em água

B = CH₃CN a 90% em água

Gradiente: 20% de A a 100% de B durante 10 minutos

Tempo de retenção	% de Área	Identidade
0,53 minutos	0,95	desconhecido
2,65 minutos	97,27	ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético
4,54 minutos		éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético

RMN de ¹H (500,16 MHz, CD₃OD) δ 2,258 (s largo, 2H), 1,858 (s, 6H), 1,674, 1,615 (AB q largo, J = 11,54 Hz, 4H)), 1,588-1,526 (m, 2H) ppm

RMN de ¹³C (125,77 MHz, CD₃OD) δ 167,957, 96,356, 69,322, 48,070, 45,360, 44,794, 37,050, 36,039, 31,631 ppm

EXEMPLO 28

Preparação de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II)

Um balão de 500 mL com três tubuladuras foi carregado com ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético (Fórmula IX) (38,67 g, 138,5 mmol). A este material adicionou-se água

(160 mL) e NaOH 1 N (138 mL, 138 mmol; o NaOH 1 N foi utilizado para gerar o sal de sódio do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético para evitar problemas de formação de espuma que podem ocorrer com NaHCO₃ sólido) para produzir uma solução turva. A esta solução adicionou-se NaHCO₃ sólido (29,10 gramas, 346 mmol, 2,50 equivalentes). Após a adição do NaHCO₃, a mistura reaccional tornou-se uma suspensão à medida que o sal de sódio do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético foi forçado a sair da solução. O reactor foi equipado com um condensador de refluxo/entrada de árgon e aquecido a aproximadamente 80 °C. Após aquecimento durante, aproximadamente, 6 horas, a mistura foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. A mistura reaccional (pH 7,22) foi cuidadosamente acidificada (evolução de CO₂) a pH 0,15 pela adição de HCl concentrado (necessários 32 mL). A mistura resultante foi extraída com acetato de etilo (4 x 300 mL). A camada aquosa (pH 0,37) após a primeira extracção com acetato de etilo foi baixada para pH 0,18 pela adição de HCl concentrado (aproximadamente, 2 mL). As fracções de acetato de etilo foram combinadas e lavadas com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (100 mL). Após secagem sobre sulfato de magnésio anidro, o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir ácido 3-hidroxi- α -oxotriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) na forma de um sólido granulado incolor: 30,77 g (99%).

Análise elementar: C₁₂H₁₆O₄:

Calculada: C, 64,27; H, 7,19%

Determinada: C, 64,30; H, 7,13%

RMN de ¹H (500,16 MHz, D₂O) δ 2,288 (s largo, 1,33H), 2,227 (s largo, 0,67H), 1,819-1,575 (m, 12H) ppm - hidrato parcial

RMN de ^{13}C (125,77 MHz, D_2O) δ 207,704, 174,583, 169,608, 98,109,
 69,618, 68,830, 47,538, 43,716,
 43,251, 43,190, 42,907, 42,563,
 36,073, 34,677, 34,232, 30,006,
 29,865 ppm - hidrato parcial

Laboratório de HPLC:

YMC S3 ODS-A 120 Å (4,6 x 50 mm), λ = 200 nm, 2,5 mL/minuto

Solventes: A = H_3PO_4 a 0,2% em água

B = CH_3CN a 90% em água

Gradiente: 10% de A a 60% de B durante 10 minutos

Tempo de retenção	% de Área	Identidade
1,39 minutos	100%	ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decano-1-acético
4,95 minutos		ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)-acético

EXEMPLO 28A

Preparação de ácido 3-hidroxi-<a-oxotriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula II) utilizando um procedimento num só reactor

Um balão de 250 mL com três tubuladuras equipado com uma ampola de adição de equalização da pressão e entrada de argon foi carregado com éster metílico do ácido dicloro-(3-hidroxi-adamantan-1-il)acético (Fórmula VIII), preparado como descrito no Exemplo 26 (15 g, 51,16 mmol) seguido pela adição de tetra-hidrofurano (30 mL, não estabilizado). Após agitação durante vários minutos, a maior parte do éster metílico de

Fórmula VIII dissolveu-se para produzir uma solução turva. A esta solução adicionou-se água destilada (30 mL) e formou-se uma suspensão solta. A ampola de adição foi carregada com NaOH 1 N (69 mL, 69 mmol, ~1,35 eq em relação à quantidade de composto de Fórmula VIII). Adicionou-se, gota a gota, NaOH durante 70 minutos para produzir uma solução praticamente incolor que foi deixada com agitação à temperatura ambiente.

A análise por HPLC a ~16 horas mostrou a hidrólise completa do composto de Fórmula VIII. A mistura reaccional, uma solução incolor límpida, com um pH de 13,24, foi ajustada para pH 7,40 pela adição de HCl ~6 N (2,8 mL). Adicionou-se NaHCO₃ sólido (11,2 g, 0,133 mol, 2,60 eq) para formar uma suspensão.

A análise por HPLC após aquecimento durante 4 h 15 min, mostra que a reacção está completa. Após aquecimento durante 5 horas, a fonte de calor foi removida e a mistura reaccional (solução incolor límpida) foi deixada arrefecer. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi armazenada num frigorífico (+4 °C) durante 4 dias.

Após armazenamento no frio durante 4 dias, a mistura reaccional era ainda uma solução incolor límpida e a análise por HPLC mostra pouca, se alguma, alteração por armazenamento. Após aquecimento até à temperatura ambiente, a mistura (pH 7,77) foi acidificada a pH 0,20 por adição cuidadosa de HCl concentrado (necessários 11 mL, evolução de CO₂; a pH ~1,40 começou a precipitar um sólido incolor). A suspensão resultante foi extraída com EtOAc (x 4, ~500 mL de volume total; análise por HPLC realizada na fracção aquosa depois de cada extracção com EtOAc). A camada aquosa (pH 0,38) após a 1^a extracção com EtOAc foi ajustada para pH 0,18 por adição de HCl conc. (necessários

~1,6 mL). A camada aquosa (pH 0,37) após a 2ª extracção com EtOAc foi ajustada para pH 0,17 pela adição de HCl conc. (necessários ~0,8 mL). A camada aquosa não precisou de ajustamento adicional do pH após as restantes extracções com EtOAc (extracção nº 3, pH 0,19; extracção nº 4, pH 0,19). As fracções orgânicas foram combinadas. Após secagem (MgSO_4), o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir o composto em epígrafe de Fórmula II em bruto como um sólido praticamente incolor, granulado que foi seco em vácuo (bomba) durante 16 horas: 11,42 g (99,53% de rendimento); HPLC, 100% (% em área).

Análise elementar: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_3$ [55465-020-31, TR46373]

Calculada: C, 64,27%; H, 7,19%

Determinada: C, 64,19%; H, 7,09%

O composto de Fórmula II em bruto (5,0 g) foi dissolvido com aquecimento a ~85 °C em água destilada (19 mL), depois, removido da fonte de calor e deixado arrefecer. A ~53 °C, o material começou a cristalizar. Depois de repousar à temperatura ambiente durante ~2 horas, o sólido foi recolhido por filtração e lavado com água gelada. A maior parte da água foi removida por passagem de azoto através do bolo de filtração. O material foi, então, seco em vácuo (bomba) durante 17 horas para produzir o composto em epígrafe de Fórmula II como agulhas incolores grandes: 4,33 g (recuperação de 86,6%); p.f. 164,5-165,6 °C (no sistema Mettler FP800); HPLC, 100% (% em área).

Análise elementar: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_3$ [55465-023-15, TR46905]

Calculada: C, 64,27%; H, 7,19%

Determinada: C, 64,42%; H, 7,04%

EXEMPLO 29

Esterificação do ácido L-piroglutâmico (Fórmula E) para formar éster etílico do ácido L-piroglutâmico (Fórmula F)

Um reactor foi carregado com etanol (49,0 litros) e arrefecido a -5°C . O reactor foi, então, carregado com cloreto de tionilo (4,97 kg) de modo que a temperatura da mistura não excedesse 0°C . Após a adição completa do cloreto de tionilo, a mistura foi de novo arrefecida para -5°C e adicionou-se ácido L-piroglutâmico (Fórmula E) em porções de modo que a temperatura fosse mantida entre 0 e -5°C durante a adição. Após a adição do ácido, a mistura reaccional foi aquecida a 20°C a 25°C e agitada durante 5 horas. A mistura reaccional foi, então, evaporada em vácuo ($T_{\text{max}} 45^{\circ}\text{C}$) até aproximadamente 15% do seu volume original. O óleo remanescente foi, então, dissolvido em tolueno (49 litros). A solução de tolueno foi, em seguida, arrefecida até, aproximadamente, 10°C e adicionou-se trietilamina (8,45 kg) lentamente de modo que a temperatura máxima estivesse entre 20 e 25°C . A suspensão resultante foi agitada durante 30 minutos e depois filtrada. O bolo de filtração foi lavado com tolueno (cerca de 5 litros). O filtrado foi reduzido a 50°C em vácuo para um volume total de cerca de 10 litros. A cristalização foi iniciada pela adição lenta de ciclo-hexano (8 litros) a 50°C e arrefecimento subsequente a, aproximadamente, 30°C . Após a formação dos núcleos, a mistura foi arrefecida a 20 a 25°C e carregada com uma segunda porção de 8 litros de ciclo-hexano. A mistura foi, então, arrefecida para 6 a 8°C , agitada durante uma hora e os cristais resultantes foram separados por filtração. Os cristais foram lavados duas vezes com ciclo-hexano (4 litros em cada lavagem).

O rendimento foi de 4,89 kg (82%) de éster etílico do ácido L-pirolglutâmico (Fórmula F) como agulhas incolores.

EXEMPLO 30

Protecção com BOC do éster etílico do ácido L-pirolglutâmico (Fórmula F)

O éster etílico do ácido L-pirolglutâmico (Fórmula F) (5,00 kg) foi dissolvido à temperatura ambiente em tolueno (24,97 litros). Adicionou-se então 4-dimetilaminopiridina (0,19 kg) à solução. A mistura reaccional foi, então, carregada com uma solução de anidrido BOC (7,29 kg) dissolvido em tolueno (24,97 litros) de tal modo que a temperatura da reacção não excedesse 25 °C. Depois de completada a adição, a reacção foi agitada durante três horas à temperatura de 25 °C. A mistura reaccional foi, então, carregada com solução semi-saturada de NaHCO₃ (49,94 litros) e agitada vigorosamente durante 10 minutos antes de se separar as fases orgânica e aquosa. A camada orgânica separada foi lavada duas vezes com água (24,97 litros cada). O solvente da camada orgânica foi depois evaporado em vácuo a um máximo de 50 °C. O óleo remanescente incolor a ligeiramente amarelado cristalizou em repouso. O rendimento teórico foi de 8,18 kg, (31,81 mol) de éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido (5S)-2-oxopirrolidino-1,5-dicarboxílico (Fórmula G).

EXEMPLO 31

Redução com SuperHidreto e eliminação

Dissolveu-se éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido (5S)-2-oxopirrolidino-1,5-dicarboxílico (Fórmula G) (4,80 kg) em tolueno (30,97 litros; Kf max 0,01% de água) e arrefeceu-se a -50 °C. Esta solução foi carregada com SuperHidreto (LiEt_3BH 1 M em THF; 19,96 litros) de tal modo que a temperatura da reacção não excedesse -45 °C. Após adição completa, a mistura foi agitada a -45 a -50 °C durante 30 minutos. Adicionou-se então N-etildiisopropilamina (DIPEA; 14,47 litros) à mistura reaccional de tal modo que a temperatura não excedesse -45 °C. Adicionou-se dimetilaminopiridina (0,030 kg) como um sólido à mistura. A mistura reaccional foi, então, carregada com anidrido trifluoroacético (TFAA) (4,70 kg) de tal modo que a temperatura da reacção não excedesse -45 °C. Após adição completa, a mistura reaccional foi aquecida a 20 a 25 °C numa hora e mantida durante mais 2 horas a esta temperatura. A mistura reaccional foi, então, arrefecida a 0 °C e carregada lentamente com água (48,00 litros) de modo que a temperatura da reacção não excedesse 5 °C. As fases aquosa e orgânica foram então separadas e a fase orgânica foi lavada novamente com 48 litros de água (0 a 5 °C). A camada orgânica foi depois evaporada e desgaseificada a 40 °C. Obteve-se um óleo amarelado com um rendimento de 4,5 kg (18,66 mol, 100%) do éster 1-(1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, (BOC-DHPEE) (Fórmula III).

EXEMPLO 32

Hidrólise de BOC-DHPPEE (Fórmula III)

Uma solução preparada a partir de éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, (BOC-DHPPEE) (Fórmula III) (6,00 kg) e etanol (24,00 litros) foi arrefecida para 0 a 5 °C e lentamente tratada a esta temperatura com uma solução de hidrato de hidróxido de lítio (2,09 kg) em água (20,87 litros) para produzir uma solução turva. Esta solução turva foi depois aquecida para 20 a 25 °C e agitada durante 2 horas a esta temperatura. A mistura reaccional foi depois evaporada até um volume de, aproximadamente, 10,5 litros a uma temperatura máxima de 40 °C em vácuo e carregada com água (24,00 litros) e éter t-butilmetílico (TBME ou MTBE) (24 litros) e misturada durante 10 minutos. As fases orgânica e aquosa resultantes foram separadas e a fase aquosa foi novamente carregada com 24 litros de TMBE. Esta mistura foi depois arrefecida para 5 a 10 °C e o pH foi ajustado para 2,3 utilizando H_3PO_4 a 85%-água (1:4) enquanto era vigorosamente agitada. A temperatura foi mantida durante este processo a de 5 a 10 °C para estabilidade. As camadas orgânica e aquosa resultantes foram separadas. A camada orgânica foi armazenada e a camada aquosa foi novamente extraída com 24 litros de TBME pré-arrefecido a 5 a 10 °C. A camada orgânica resultante foi combinada com a camada orgânica armazenada e carregada com diisopropiletilamina (DIPEA) (4,82 kg). A solução foi, então, evaporada e desgaseificada a uma temperatura máxima de 30 °C em vácuo. O rendimento foi de 7,84 kg (22,88 mol, 92%) [N-BOC desidroprolina*DIPEA (BOC-DHP)].

EXEMPLO 33

Formação de amida em BOC-DHP

BOC-DHP, sintetizado por saponificação como descrito no Exemplo 32, pode conter água. Por isso, aplicou-se uma destilação azeotrópica com tolueno antes de realizar a reacção. No entanto, devido ao excesso de reagentes, o cálculo das matérias-primas foi baseado na quantidade de BOC-DHP antes da remoção de qualquer água. Para destilação azeotrópica, foi diluído BOC-DHP com tolueno até uma solução aproximada de 30%. O tolueno foi removido em vácuo a 40 °C. O BOC-DHP tratado (6,00 kg) foi, então, dissolvido em THF (48,0 litros). A solução foi carregada com DIPEA (2,26 kg) e a mistura reaccional foi arrefecida a -20 a -25 °C. Adicionou-se então cloreto de mesilo (3,01 kg) lentamente. Durante esta adição, precipita cloridrato de DIPEA. A suspensão resultante foi, então, agitada durante 2 horas a -20 °C, seguida por saturação com amónia através de uma entrada de gás sob a superfície. Durante a adição de amónia, a reacção foi aquecida a 0 °C. Após a saturação, a mistura reaccional foi aquecida a 20 °C e agitada durante 3 horas. Após a agitação, a mistura reaccional foi filtrada para remover o cloridrato. O bolo de filtração foi lavado com THF (12 litros) em várias porções. O filtrado foi concentrado em vácuo a uma temperatura máxima de 40 °C e, depois, dissolvido em cloreto de metileno (33,33 litros). A solução foi lavada com água (26,66 litros). As fases orgânica e aquosa resultantes foram separadas e a fase aquosa foi extraída duas vezes com cloreto de metileno (20 litros cada). As camadas orgânicas resultantes foram combinadas e concentradas em vácuo e desgaseificadas para remover qualquer excesso de base de Hünig. O rendimento foi de 3,35 kg (15,77 mol, 90%) de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do

ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (BOC-DHPA) (Fórmula IV).

EXEMPLO 34

Ciclopropanação de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV)

Um primeiro reactor, Reactor A, foi carregado com BOC-DHPA (Fórmula IV) (4 kg) dissolvido em cloreto de metileno (18,0 litros) e mantido a 20 °C. Um segundo reactor, Reactor B, foi carregado com cloreto de metileno (18,00 litros) e arrefecido a -30 °C. O Reactor B foi, então, carregado com dimetoxietano (DME) (3,36 kg), seguido por uma solução a 30% de dietil zinco (15,36 kg) em tolueno, enquanto se mantinha a temperatura entre -30 e -25 °C. O Reactor B foi depois carregado com diiodometano (19,99 kg), mantendo a temperatura da reacção entre -30 e -25 °C. Após adição completa do diiodometano, a mistura foi agitada durante 45 minutos a -30 a -25 °C. Esta mistura foi, então, carregada no Reactor A através de uma tubagem arrefecida (-20 a -25 °C). O carregamento foi realizado lentamente em porções de, aproximadamente, 5%, de modo que a temperatura de reacção do Reactor A fosse mantida entre 22 e 24 °C até a reacção estar completa. Uma vez completada a reacção, a mistura do reactor A foi arrefecida para 5 a 10 °C. A mistura reaccional foi, então, lentamente carregada com uma solução saturada de bicarbonato (21,6 litros) de tal modo que a temperatura da reacção não excedesse 15 °C. Após esta adição, a mistura reaccional foi agitada durante, pelo menos, uma hora, enquanto se formava um precipitado. A suspensão foi filtrada. O

bolo de filtração resultante foi transferido de volta ao reactor, suspenso novamente com cloreto de metileno (14,4 litros) durante 30 minutos; e re-filtrado. Após esta segunda filtração, o bolo de filtração foi lavado com adição de cloreto de metileno (7,2 litros). Os filtrados foram depois separados em fases aquosa e orgânica e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa semi-saturada de cloreto de sódio (21,6 litros). O solvente foi, então, removido em vácuo a uma temperatura máxima de 30 °C e trocado por heptano. Obteve-se uma suspensão do produto em bruto em heptano. O volume final da suspensão depois da troca de solvente foi de 14,4 litros. O produto em bruto foi isolado por filtração. O bolo de filtração foi lavado com heptano (2,9 litros) e, depois, seco em vácuo até um peso constante. O rendimento bruto foi de 2,76 kg (12,2 mol, 72%) de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H). Para purificar, o material em bruto é suspenso numa quantidade de 8 vezes de uma mistura 1:1 de acetato de butilo/heptano a 20 a 22 °C durante 4 horas. O material foi filtrado e o bolo de filtração foi lavado com uma quantidade aproximada de 1 vez de heptano. O rendimento foi 2,11 kg (9,33 mol, 55%) de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a]-3-aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (Fórmula H).

EXEMPLO 35

Desprotecção de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H) para formar (1S,3S,5S)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J)

Um balão de 100 mL com 2 tubuladuras equipado com um agitador mecânico e um termopar foi carregado com éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-aminocarbonil)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (Fórmula H) (5,0 g, 22,1 mmol) e THF (20 mL). Adicionou-se então HCl (2,5 M em EtOAc, 25 mL, 62,5 mmol) à suspensão. A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 18 horas, período durante o qual se observou precipitação. A conclusão da reacção foi monitorizada por HPLC. Adicionou-se éter metil-t-butílico (MTBE) (30 mL) à suspensão e a agitação foi continuada durante mais 30 minutos. A suspensão foi, então, filtrada sob protecção com N₂ para produzir um sólido branco que foi lavado com MTBE (20 mL). O sólido foi seco numa estufa a pressão reduzida durante 48 horas para produzir o sal cloridrato de (1S,3S,5S)-2-azabicciclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (Fórmula J; 3,6 gramas, 100%).

EXEMPLO 35A

Preparação alternativa de éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico (Fórmula IV)

A. Conversão do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil)

A uma suspensão de 10,4 g (25,86 mmol) de sal de diciclo-hexilamina sólida (DCHA) numa mistura de 30 mL de água, 40 mL de tolueno e 10 mL de MTBE adicionaram-se 2,7 mL de NaOH aquoso 10 N (27 mmol) (o excesso de NaOH deve ser limitado a 1,05 eq. ou menos). Por agitação resultou uma mistura bifásica com camadas límpidas e todos os sólidos dissolvidos. As fases foram separadas. O extracto orgânico contendo o sal de sódio do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) foi extraído com 4 mL de água que foi adicionada à fase aquosa inicial. A quantificação por HPLC produziu 12,55% (p/p) de teor "olefina-ácido livre" na fase aquosa ou 96% de recuperação.

B. Produção de DMT-MM

A uma solução de 2-Cl-4,6-diMeO-1,3,5-triazeno (CDMT) (6,2 mg, 35 mmol; 1,5 eq) em 70 mL de EtOAc mantida num banho de água à temperatura ambiente adicionaram-se 4 mL (36,38 mmol) de N-metilmorfolina pura (MM). O cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio sólido (DMT-MM) começou a separar-se por precipitação. A suspensão contendo DMT-MM foi agitada durante 30 min à temperatura ambiente, altura em que se

tornou numa pasta espessa. A temperatura subiu de 23 para 28-29 °C durante a reacção. A temperatura da reacção é mantida baixa para minimizar a desmetilação competitiva para formar di-MeO-N morfolino-triazeno (DMMT).

C. Conversão do sal de sódio do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) em éster 1-(1,1-dimetiletílico) do ácido (5S)-5-aminocarbonil-4,5-di-hidro-1H-pirrole-1-carboxílico IV

A uma solução de sal de sódio de sal de sódio da Parte A equivalente a 5 g (23,5 mmol) de olefina-ácido livre por quantificação por HPLC (V = 25 mL) adicionou-se NH₄Cl sólido (3,75 g, 70 mmol, 3 eq.), altura em que o pH caiu de 14 para 8,9. A esta solução adicionou-se NaH₂PO₄·xH₂O suficiente para ajustar o pH para pH = 6,20. Nota: A quantidade de fosfato pode variar dependendo do excesso inicial de NaOH utilizado para converter o sal de DCHA em sal de Na. A solução tamponada de sal de sódio foi vertida numa suspensão de DMT-MM preparada como acima na Parte B.

A mistura bifásica foi agitada à t.a. durante 4 h, altura em que a emulsão inicial se tornou uma suspensão e alguns DMHT separaram-se por precipitação. Por HPLC a reacção estava completa e nem éster de DTM activado nem ácido eram evidentes em qualquer fase.

Nas condições reaccionais, 12-15% em peso de éter 4,6-diMeO-1,3,5-triazeno (éter de DMT) é também formado através de uma reacção de DMT-MM e DMHT. A suspensão foi filtrada para remover o 4,6-diMeO-1,3,5-triazeno (DMHT) e as fases foram separadas. A

fase orgânica rica foi lavada com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ aquoso 2 N (2x25 mL) ou até o pH (aq.) < 6, o que implicou que a maior parte da N-metilmorfolina fosse removida da fase orgânica. As fases foram separadas e a fase orgânica rica foi lavada com 25 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

Tipicamente o rendimento da solução do composto IV em epígrafe é 87-90%; olefina-ácido de partida que não reagiu de 1-0%. A fase orgânica rica foi evaporada no evaporador rotativo e seca azeotropicamente com EtOAc fresco (2x250 mL). O material cristalizou parcialmente. A mistura foi dissolvida em 8 mL de EtOAc quente e misturada com 10 mL de n-heptano. Começou a separar-se um sólido. A suspensão foi agitada a 50 °C durante 30 min e adicionaram-se mais 10 mL de n-heptano. A suspensão foi agitada durante 30 min, à temperatura ambiente, depois de ter sido removida do banho de aquecimento e a cada 30 min são feitas duas cargas adicionais de heptano e a suspensão é agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente para completar a cristalização. O sólido é filtrado e seco. O rendimento de cristalização típico está próximo de 90%; a potência do composto IV em epígrafe é de 90% e o éter de DMT é responsável pelos restantes 10% em peso.

Verificou-se que o sólido formado é um verdadeiro co-cristal do composto IV em epígrafe e éter de DMT que deu um único p.f. agudo de 97,4 °C em comparação com o p.f. da amida de 89,7 °C por DSC. A forma de co-cristal é mais cristalina e separa-se mais prontamente da solução.

EXEMPLO 35B

Preparação do sal diciclo-hexilamina do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil)

A. Preparação do sal de sódio do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil)

Adicionaram-se 3 volumes de etanol a uma solução de tolueno de ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil) (cerca de 15% em peso a 25% em peso) (1 g/mL). A solução foi arrefecida para 0-5 °C. À solução adicionou-se lentamente uma solução NaOH-água 5 N (2 eq.), enquanto se mantinha a temperatura <5 °C (ligeiramente exotérmica). A mistura reaccional foi aquecida a 20-25 °C e agitada até a reacção estar completa.

Adicionaram-se 4 volumes de água à mistura reaccional e a mistura reaccional foi destilada em vácuo (temperatura do banho 40 °C) para remover o etanol. Ao resíduo adicionaram-se 0,5 volumes de tolueno (0,865 g/mL) e a mistura foi agitada durante 10 minutos. Formaram-se as camadas aquosa e orgânica. A camada aquosa contendo o sal de sódio foi separada e utilizada na Parte B.

B. Preparação do sal diciclo-hexilamina do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil)

Adicionou-se 1 volume de MTBE (0,74 g/mL) a uma solução aquosa de sal de sódio do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-

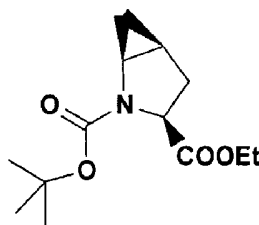
dicarboxílico, 1-(1,1-dimetiletil). Adicionaram-se 0,2 volumes de heptano (0,684 g/mL) à solução anterior e a solução resultante foi arrefecida para 0-5 °C. À solução adicionou-se lentamente H₃PO₄ a 85% (1 g/mL) para levar o pH para 2,5-3 enquanto se mantinha a temperatura <5 °C (ligeiramente exotérmica). As camadas resultantes foram separadas e à camada orgânica contendo o produto foi adicionado 1 volume de solução aquosa saturada de cloreto de sódio a 75%. A mistura foi agitada durante 10 minutos e as camadas resultantes foram separadas. O produto estava contido na camada orgânica.

A solução orgânica foi arrefecida para 0-5 °C e adicionou-se diciclo-hexilamina (0,91 g/mL) lentamente (ligeiramente exotérmica) enquanto se mantinha a temperatura <10 °C. A mistura reaccional foi agitada a 0-5 °C durante 3 horas. Os sólidos foram separados por filtração e lavados com 0,5 volumes de MTBE/heptano 1:1. O sal DCHA resultante (1 g/mL) foi seco e recuperado.

EXEMPLO 35C

Preparação alternativa de éster etílico, 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, (Fórmula H) (também referido como sin-N-BOC-4,5-metanoprolina)

A. Preparação de éster etílico de (s)-BOC-4,5-metanoprolina



Um balão de 3 tubuladuras seco à chama (agitação magnética) foi carregado com 2,2 g de éster 1-(1,1-dimetiletílico), 5-etílico do ácido 4,5-di-hidro-1H-pirrole-1,5-dicarboxílico, (2,20 g, 9,12 mmol, 1 eq) e 22 mL de tolueno seco. A solução resultante foi arrefecida para -30° e adicionalmente carregada gota a gota com 16,58 mL (18,24 mmole) de dietilzínco (solução 1,1 M em tolueno).

Uma solução de 2,66 mL (6,43 g, 36,47 mmol) de cloroiodometano em 2,2 mL de tolueno foi adicionada, gota a gota, mantendo a temperatura da reacção entre -25 °C e -30 °C. A reacção foi mantida a -20 °C durante 16 horas. A reacção foi, então, desactivada com 22 mL de solução semi-saturada de bicarbonato de sódio e aquecida até à temperatura ambiente. Formou-se um precipitado branco que foi removido por filtração

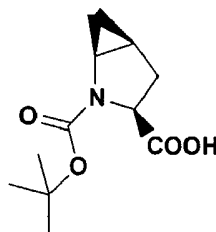
sobre Hyflow (auxiliar de filtração) e lavado com tolueno (cerca de 10 mL). A camada orgânica foi separada do filtrado bifásico e lavada duas vezes com água (11 mL de cada vez). A camada orgânica foi evaporada até à secura para produzir um óleo amarelado (2,33 g), que era o éster etílico de N-BOC-metanoprolina (mistura de sin e anti-isómeros (8:1)).

O procedimento acima foi utilizado para produzir grandes quantidades da mistura de isómeros acima suficientes para utilização no passo seguinte. A 20-25 °C, agitaram-se vigorosamente 3,40 kg de éster etílico de N-BOC 4,5-metanoprolina (mistura de sin e anti-isómeros) com 5,17 kg (66,59 g/mol) de metilamina a 40,0% (solução em água) sob uma atmosfera de azoto.

Depois de completada a reacção, a mistura foi diluída com 5,17 L de água e 5,17 L de MTBE e agitada durante mais 5 minutos antes de ocorrer a separação das fases. A camada orgânica foi lavada com 5,17 L de água. A camada orgânica resultante foi evaporada (vácuo, Tmax 40 °C) até peso constante.

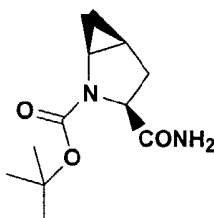
Obteve-se um rendimento de 2,52 kg de éster etílico de sin-N-Boc-4,5-metanoprolina (9,85 mol, 74%).

B. Preparação de s-BOC-4,5-metanoprolina



Prepara-se uma solução de 2,57 kg de éster etílico de sin-N-BOC-4,5-metanoprolina (s-BOC-MPEE) em 10,28 L de etanol. A esta solução adiciona-se a 20-28 °C uma solução feita de 0,51 kg de hidrato de hidróxido de lítio em 5,07 L de água. A reacção foi realizada com protecção de gás inerte (azoto). A mistura reaccional é agitada durante 14 h a 20-25 °C (IPC). Após reacção completa, a mistura evaporou a 40 °C (vácuo). O óleo resultante foi tomado em 25,70 L de água e 25,70 L de MTBE e agitado durante 30 min. A fase orgânica foi separada e a camada aquosa é novamente extraída com 12,85 L de MTBE. À fase aquosa adicionam-se 25,70 L de MTBE e o pH da mistura foi ajustado para pH 2 por adição de HCl 1 N (cerca de 12 L). A camada orgânica foi separada e a fase aquosa foi re-extraída com 12,85 L de MTBE. As camadas orgânicas combinadas do passo anterior são evaporadas até à secura para dar 1,88 kg de sin-N-BOC 4,5-metanoprolina (8,25% mol, 82%).

C. Preparação de éster 1,1-dimetiletílico do ácido [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(aminocarbonil)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico



Dissolve-se 2,00 kg de sin-N-BOC-4,5-metanoprolina em 40,00 L de THF e arrefece-se para -15 °C. A esta mistura adiciona-se 1,07 kg de N-metil morfolina (P0). À mistura reaccional adicionam-se 1,32 kg de cloroformato de isobutilo de tal modo que a temperatura da reacção não exceda -8 °C. Depois de completada a adição, a mistura é agitada durante 30 min a -10 °C (P1, IPC 1). Precipita cloridrato de N-metil morfolina da mistura reaccional.

A mistura reaccional é aquecida para -5 °C e, depois, purgada através de um tubo de entrada de gás com amónia (0,79 kg, teórico 5,00 eq.). Em seguida, a mistura reaccional é aquecida a 20-25 °C e agitada a esta temperatura durante 4 h (P2, IPC 2). À mistura reaccional adicionam-se 40,00 L de solução aquosa saturada de cloreto de sódio. Em seguida o pH da mistura é ajustado para pH 4 a 4,5 por adição de solução saturada de bissulfato de potássio. A camada orgânica é, então, separada e a fase aquosa é novamente extraída com 20,00 L de MTBE. As camadas orgânicas combinadas são evaporadas até à secura. O produto em bruto é dissolvido em 8,00 L de acetato de butilo à temperatura de refluxo. O produto precipita a cerca de 30 °C. No início da cristalização, a mistura é lentamente

tratada com 20,00 L de heptano e agitada durante mais 2 h. O produto é isolado por filtração. O bolo de filtração é lavado com duas porções de acetato de butilo/heptano frios (1:4), 1,6 L de cada e duas vezes cada com 2,00 L de heptano e seco a 30-35 °C (vácuo) para produzir 1,64 kg (7,22 mol, 82%) de sin-N-BOC 4,5-metanoprolina amida (s-BOC-MPA).

EXEMPLO 36

Protecção com BOC de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) para formar ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (VI)

Ácido de Fórmula VI

Ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) (469 gramas, 2,08 moles) foi dissolvido em NaOH 1 N gelado (5 litros, 5 moles, 2,4 equivalentes) num divisor de fases equipado com uma sonda de temperatura e uma sonda de pH. Adicionou-se THF (2,5 litros) à solução. Adicionou-se então BOC₂O sólido e a mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante, aproximadamente, 1 hora. Adicionou-se então EtOAc (4 litros) com agitação e as camadas orgânica e aquosa resultantes foram separadas. O pH da camada aquosa foi ajustado para 7 com HCl concentrado. Adicionou-se, então, EtOAc (4 litros) e adicionou-se mais HCl para baixar o pH para aproximadamente 1. O volume total de HCl concentrado adicionado foi de 510 mL. As camadas orgânica e aquosa foram novamente separadas e a camada aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 3 litros). As camadas orgânicas foram, então, combinadas e

lavadas com água (3 litros) e solução aquosa saturada de cloreto de sódio (3 litros). A camada orgânica lavada foi, então, seca com Na₂SO₄ e concentrada num evaporador rotativo à temperatura ambiente até à secura. O rendimento foi de 542 gramas de ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI).

EXEMPLO 37

Reacção de acoplamento para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-(<aS)-<a-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-<b-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula K)

Um balão de 2 L com três tubuladuras equipado com um termómetro, um agitador mecânico e uma entrada de gás foi carregado com ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi)-carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula VI) (50 gramas, 153,8 mmol). Adicionou-se THF (200 mL) e agitou-se para produzir uma solução límpida. A solução foi arrefecida para -6 °C num banho de acetona-gelo seco-água. Adicionou-se, então, cloreto de metanossulfonilo (Mes-Cl) (13 mL, 1,169 mmol, 1,1 equivalentes) como uma única porção, seguido por diisopropiletilamina (94 mL, 539 mmol, 1,1 equivalentes). A diisopropiletilamina foi adicionada lentamente durante um período de cerca de 4 minutos para manter a temperatura interna abaixo de 8 °C. A mistura reaccional foi agitada a 0 °C até todo o ácido ter sido convertido no anidrido misto. Adicionou-se, então, sal cloridrato de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (32,5 g, 200 mmol, 1,1 equivalentes) e hidroxibenzotriazole (HOBT) (1,04 g, 7,6 mmol,

0,05 equivalentes) numa única porção e o balão foi retirado do banho de arrefecimento. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas e, depois, deixada, de um dia para o outro, à temperatura ambiente.

EXEMPLO 38

Protecção com BOC de ácido (<aS)-<a-amino-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético (Fórmula V) para formar sal 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano do ácido (<aS)-<a[[(1,1-dimetiletoxi) carbonil] amino]-3-hidroxitriciclo [3.3.1.1^{3,7}]decano-1-acético, (Fórmula VIA)

Fórmula VIA (sal DABCO)

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) (15 g; 125,1 mmol) foi carregado numa solução de cerca de 30 g (135 mmol) do ácido de Fórmula VI do Exemplo 36 em 300 mL de acetato de isopropilo. O acetato de etilo (150 mL) foi carregado na mistura reaccional acima (proporção em volume de acetato de etilo:acetato de isopropilo (150 mL/300 mL)). A mistura reaccional foi nucleada com sal DABCO de Fórmula VIA (200 mg). A mistura reaccional foi agitada vigorosamente, à temperatura ambiente. Água (5 mL) foi lentamente carregada na mistura reaccional e a mistura reaccional foi agitada vigorosamente, à temperatura ambiente, para induzir a formação de cristais após 15-20 minutos. A mistura reaccional foi agitada durante 16 horas à temperatura ambiente e o produto da reacção foi filtrado num funil de Buchner. Os sólidos foram lavados com acetato de etilo à temperatura ambiente e secos a 50 °C em vácuo para produzir 47 g (79%) do sal DABCO de Fórmula VIA.

EXEMPLO 39

Reacção de acoplamento para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula K)

Um balão de 250 mL com três tubuladuras equipado com um termómetro, um agitador mecânico e uma entrada de gás foi carregado com sal 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano do ácido (α S)- α [(1,1-dimetiletoxi)-carbonil]amino]-3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano-1- acético (Fórmula VIA) (5 g, 11,44 mmol), preparado no Exemplo 38. Adicionou-se THF (25 mL) e agitou-se para produzir uma suspensão. A suspensão foi arrefecida para 0 °C num banho de água e gelo. Adicionou-se, então, cloreto de metanossulfonilo (Mes-Cl) (1,15 mL, 14,85 mmol, 1,3 equivalentes) como uma única porção, seguido por diisopropiletilamina (94 mL, 40 mmol, 3,5 equivalentes). A diisopropiletilamina foi adicionada lentamente durante um período de cerca de 4 minutos para manter a temperatura interna abaixo de 5 °C. A mistura reaccional foi agitada a 0 °C durante 10 minutos até todo o ácido estar convertido no anidrido misto. Adicionou-se, então, sal cloridrato de (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxamida (2,42 gramas, 14,9 mmol, 1,3 equivalentes) e hidroxibenzotriazole (HOBt) (77 mg, 0,57 mmol, 0,05 equivalentes) numa única porção e o balão foi removido do banho de arrefecimento. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas e deixada de um dia para o outro à temperatura ambiente.

EXEMPLO 40

Desidratação e hidrólise para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-(*aS*)-*a*-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-*b*-oxo-(1*S*,3*S*,5*S*)-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-etanocarbâmico (Fórmula L)

Adicionou-se piridina (6 equivalentes, 922 mmol, 74,6 mL) à mistura reaccional do Exemplo 39 e a mistura reaccional foi arrefecida num banho de arrefecimento a -8 °C. Adicionou-se, então, anidrido trifluoroacético (TFAA) (4 equivalentes, 616 mmol, 87 mL) lentamente ao longo de 6 minutos enquanto se mantinha a temperatura abaixo de 10 °C. A reacção foi agitada a 24 °C durante 0,5 h e verificada através de HPLC (30 mL, 0,5 mL de AcN, 0,5 mL de H₂O) quanto ao desaparecimento do Composto K do Exemplo 37.

A reacção foi, então, arrefecida num banho de arrefecimento a cerca de -3 °C. Adicionou-se NaOH (5 N, 6 equivalentes, 0,925 mol, 185 mL) à reacção durante 10 minutos (pH aquoso = 9,9) enquanto se mantinha a temperatura da reacção abaixo de 10 °C. Adicionou-se K₂CO₃ aquoso (319 gramas, 15 equivalentes, dissolvidos em 510 mL de H₂O) durante 5 minutos (temperatura = 8 °C, pH aquoso 11,1). A reacção foi deixada decorrer durante 7 horas e 40 minutos. A reacção estava completa quando todos os intermediários foram hidrolisados ao penúltimo como determinado por meio de HPLC (30 µL, 0,5 mL de AcN, 0,5 mL de H₂O).

Adicionou-se, então, EtOAc (500 mL) à mistura reaccional e as camadas aquosa e orgânica resultantes foram separadas. A

camada orgânica foi lavada com 500 mL de solução tampão (H_3PO_4 2 M e NaH_2PO_4 1 M). A temperatura subiu para 23 °C a partir de 15 °C; tempo de adição: 5 min, V aq. = 560 mL pH = 4,5, 32 mg do produto por HPLC; V org = 1080 mL. A fase orgânica foi lavada com 500 mL de uma segunda solução tampão; V aq = 780 mL, pH = 2,5, 415 mg de produto por HPLC; V orgânico = 800 mL, 1,02% v/v de piridina. A fase orgânica foi lavada com 300 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio; V aq. = 350 mL, pH = 1,8, 20 mg produzidos por HPLC. A fase orgânica foi lavada com 130 mL de solução saturada de NaHCO_3 ; V aq. = 176 mL, pH = 6,0, 780 mg de produto. A fase orgânica foi lavada com 300 mL de solução aquosa semi-saturada de cloreto de sódio; V aq. = 330 mL, pH = 5,2, 25 mg de produto; V orgânico = 650 mL, piridina 0,045% v/v. Adicionaram-se 5 g de Darco à fase orgânica e foi agitada durante 5 min, filtrada através de 50 g de sílica, lavada com 4 x 25 mL de EtOAc, V orgânico = 750 mL, piridina 0,04% v/v.

A camada orgânica foi, então, destilada até, aproximadamente, 133 mL. A fase orgânica foi agitada durante 1 hora até a solução se tornar turva. Adicionaram-se 133 mL de heptano ao longo de 15 min e a suspensão foi agitada, de um dia para o outro. Adicionaram-se 133 mL de heptano, de um dia para o outro. A mistura foi agitada violentamente durante 20 minutos com agitação mecânica. Os sólidos foram removidos por filtração e o bolo foi lavado com 50 mL de 5% de EtOAc/heptano; verificaram-se 3,4 g do produto em 8,86 g de produto em bruto após a remoção dos solventes das águas mães. Cristais do produto seco foram aquecidos a 50 °C em vácuo, de um dia para o outro. Obtiveram-se 467 g de produto, ~73%, 96,6 AP.

EXEMPLO 41

Desprotecção para produzir benzoato de (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hidroxitriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)-1-oxoetil]-2-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carbonitrilo, (1:1) (Fórmula M)

Éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano-(α S)- α -(3-hidroxitriciclo-[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]-hexano-2-etanocarbâmico

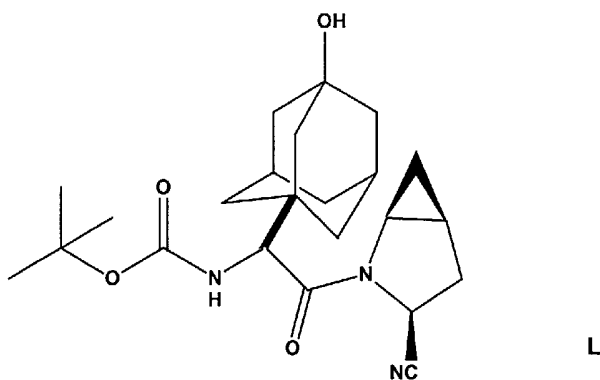
(Fórmula L) (5,0 gramas, 12,04 mmol) foi carregado num balão de três tubuladuras equipado com um termómetro, um agitador mecânico e uma entrada de gás. Adicionou-se EtOAc, aproximadamente, 45 a 50 mL, para se obter uma solução límpida. Adicionou-se HCl concentrado (3,00 mL, 37% p/p, 36,14 mmol, 3 equivalentes) à temperatura ambiente e a mistura reaccional foi agitada até ser produzido um sólido. Adicionou-se, então, água (30 mL) e a mistura foi agitada durante 1 a 2 minutos. Esta mistura reaccional foi transferida para uma ampola de separação e as camadas de mistura reaccional foram deixadas separar-se numa separação de fases limpa. A camada aquosa foi ajustada para um pH inferior de aproximadamente 6 com NaOH a 25% enquanto se mantinha a temperatura abaixo de 25 °C.

Realizou-se então uma permuta de sal por adição de álcool isopropílico (IPA; 2 a 3 mL) à camada aquosa, seguido pela adição de benzoato de sódio (0,65 mL de uma solução de benzoato de sódio preparada por dissolução de 2,6 gramas de benzoato de sódio em 6,5 mL de água). A solução de benzoato de sódio remanescente foi, então, adicionada de modo, gota a gota, por meio de uma ampola de adição. A mistura reaccional resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. Os sólidos da mistura reaccional foram, então, filtrados num funil

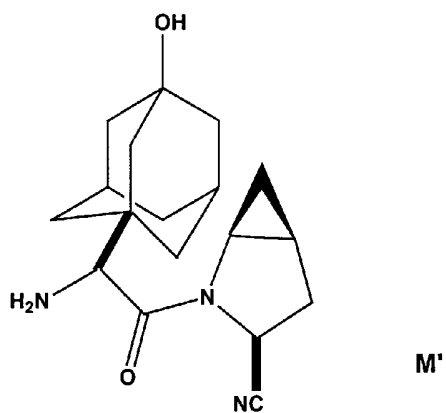
de Buchner e lavados com água até o sólido dar um teste negativo para Cl^- com AgNO_3 . Os sólidos foram, depois, lavados com heptano (10 mL) para eliminar a água, secos ao ar no funil, e secos numa estufa de vácuo a $35\text{ }^\circ\text{C}$ até $\text{KF} \leq 5\%$. O rendimento foi de 79%, 4,1 gramas.

EXEMPLO 42

Desprotecção de L

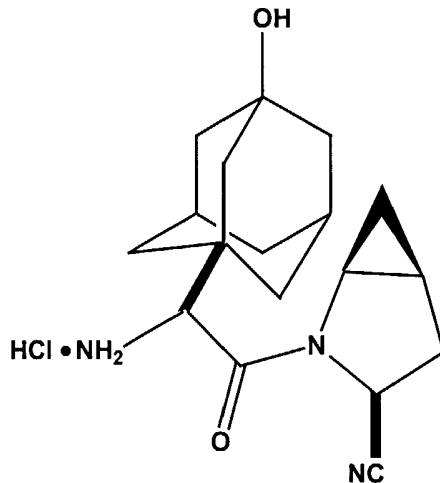


para produzir a base livre M'



Composto (L) do Exemplo 38 (300 g, 0,723 mol, potência de 90,6%), cloreto de metileno (3 L), metanol (288 mL, 7,23 mol) e ácido clorídrico concentrado (36%) (288 mL, 7,23 mol) foram carregados num balão de 12 L com 3 tubuladuras equipado com agitador mecânico, sonda de temperatura e entrada de gás N₂. A reacção ocorreu enquanto se mantinha a temperatura da reacção dentro da gama desde cerca de 20 a cerca de 25 °C. A mistura reaccional foi agitada durante 18 horas, dividida em duas fases e a camada aquosa superior foi recolhida. À camada aquosa adicionou-se cloreto de metileno (6 L) e água (720 mL), e adicionou-se, gota a gota, NaOH 5 N (~600 mL) para ajustar o pH a 9,0~10,5.

A fase orgânica contendo o sal cloridrato



(identificado por HPLC) (Fórmula L') foi tratado com cloreto de metileno (6 L) e água (720 mL), e adicionou-se, gota a gota, solução de hidróxido de sódio 5 N (~600 mL) enquanto se mantinha a temperatura da reacção entre 20 e 25 °C para ajustar o pH entre 9 e 10,5. Adicionou-se NaCl (120 g) e a mistura foi agitada durante 20 min para formar uma separação de fases. A

camada orgânica (6,2 L) foi recolhida (continha 174 g do composto M') e a camada aquosa (1,75 L) foi eliminada (continha 6,5 g do composto M').

A camada orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de cloreto de sódio com NH_4Cl a 1% (450 mL). (A solução aquosa saturada de cloreto de sódio com NH_4Cl a 1% continha 1 g de NH_4Cl , 25 g de NaCl e 74 g de H_2O). Da separação de fases resultante recuperou-se 6,0 L de camada orgânica (continha ~176 g de composto M' em solução) e a camada aquosa (0,45 L) contendo 1,4 g de composto M' (~0,4%) foi eliminada.

Adicionou-se acetato de etilo (~4 L) à fase orgânica, enquanto se removia CH_2Cl_2 por destilação a 25 °C/50 mm Hg. A destilação foi interrompida quando se atingiu um volume final de 2,5 L. A camada orgânica foi filtrada para remover NaCl sólido e foi concentrada para ~1 kg (~170 g de composto M' em 1 L de acetato de etilo) Análise por GC: DCM <0,1%. Adicionou-se, gota a gota, água (17 mL) e após 10 min começou a cristalização. Adicionou-se 17 mL de água e a suspensão resultante foi agitada durante 30 min, filtrada, o bolo foi lavado com acetato de etilo e seco à t.a. em vácuo para produzir 186 g do composto M'', rendimento de 81%.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> Métodos e compostos para a produção de inibidores de dipeptidil peptidase IV e os seus intermediários

<130> LA0084

<150> 60/431814

<151> 2002-09-12

<160> 5

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Sintética

<400> 1

tcgtcatgaa aatcgttctc gttttg

26

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

<213> Sintética

<400> 2

tactgttttt ccagcgtatt cctaggct

28

<210> 3
<211> 33
<212> ADN
<213> Sintética

<400> 3

gatgctcata tgcgcgacgt gtttgaaatg atg

33

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Sintética

<400> 4

gatcccgggc taaggcgaat taataattcg

30

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Sintética

Lisboa, 18 de Dezembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

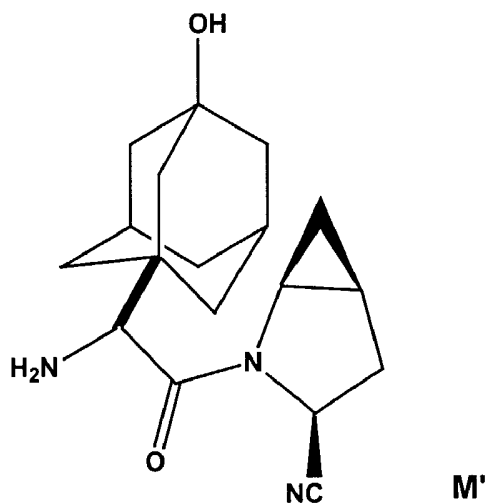
1. Método para a produção de um inibidor de dipeptidil peptidase IV à base de pirrolidina fundida com ciclopropilo compreendendo:

(a) acoplar ácido $(\alpha S)-\alpha-[(1,1\text{-dimetiletiloxi)carbonil]amino]-3\text{-hidroxitriciclo}[3.3.1.1^{3,7}]$ decano-1-acético ou o seu sal 1,4-diazabicciclo[2,2,2] octano à $(1S,3S,5S)\text{-}2\text{-azabicciclo}[3.1.0]$ hexano-3-carboxamida para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-(aminocarbonil)- $(\alpha S)-\alpha\text{-(}3\text{-hidroxitriciclo}[3.3.1.1^{3,7}]$ dec-1-il)- $\beta\text{-oxo-}(1S,3S,5S)\text{-}2\text{-azabicciclo}[3.1.0]$ hexano-2-etanocarbâmico;

(b) desidratar éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-(aminocarbonil)- $(\alpha S)-\alpha\text{-(}3\text{-hidroxitriciclo}[3.3.1.1^{3,7}]$ dec-1-il)- $\beta\text{-oxo-}(1S,3S,5S)\text{-}2\text{-azabicciclo}[3.1.0]$ hexano-2-etanocarbâmico para produzir éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano- $(\alpha S)-\alpha\text{-(}3\text{-hidroxitriciclo}[3.3.1.1^{3,7}]$ dec-1-il)- $\beta\text{-oxo-}(1S,3S,5S)\text{-}2\text{-azabicciclo}[3.1.0]$ hexano-2-etanocarbâmico; e

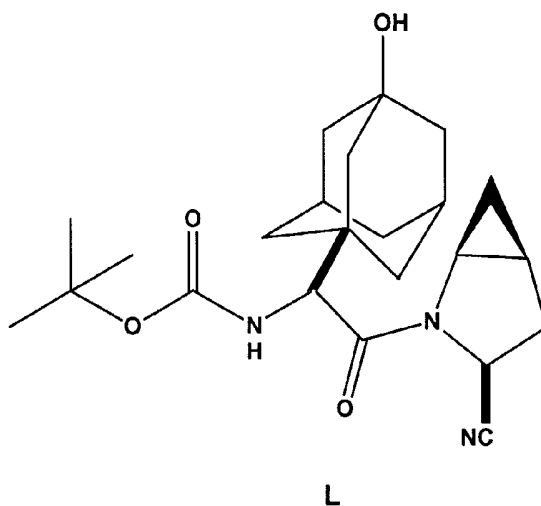
(c) desproteger éster 1,1-dimetiletílico do ácido 3-ciano- $(\alpha S)-\alpha\text{-(}3\text{-hidroxitriciclo}[3.3.1.1^{3,7}]$ dec-1-il)- $\beta\text{-oxo-}(1S,3S,5S)\text{-}2\text{-azabicciclo}[3.1.0]$ hexano-2-etanocarbâmico, para formar inibidor de dipeptidil peptidase IV.

2. Método para a preparação de um composto de base livre da estrutura M'

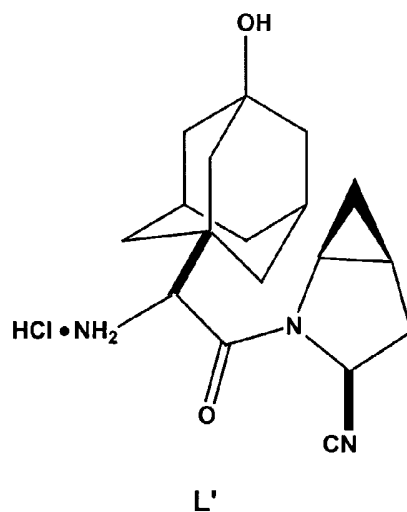


o qual compreende

proporcionar um composto protegido da estrutura L

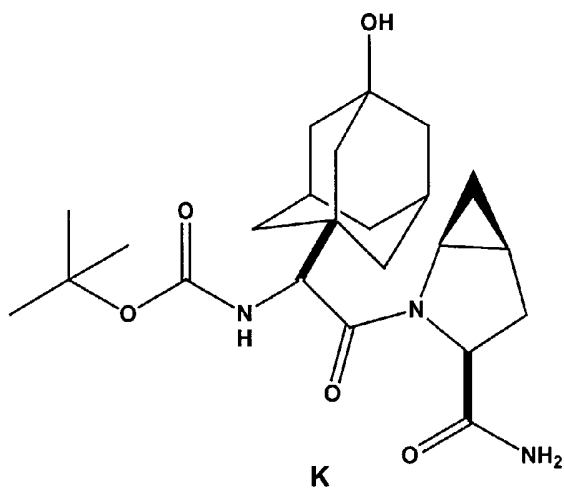


e tratar o composto L com ácido clorídrico para formar o sal de ácido clorídrico L' correspondente



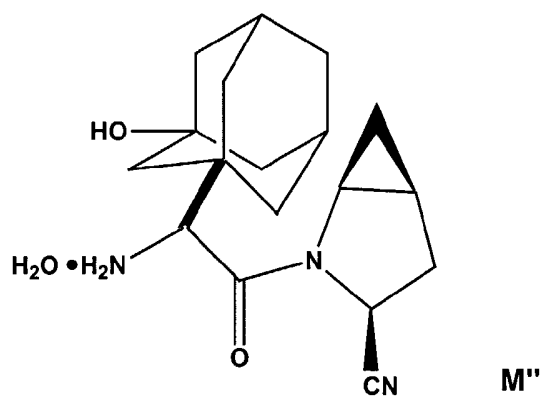
tratando o sal de ácido clorídrico L' com ácido clorídrico e hidróxido de sódio para formar o composto de base livre M'.

3. Método como definido na Reivindicação 2, em que o composto L' é formado pela desidratação do intermediário K

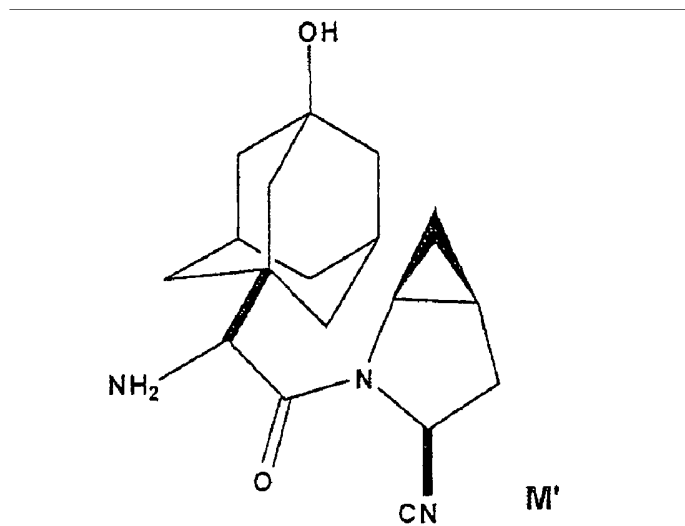


na presença de piridina e anidrido trifluoroacético e, depois, hidrólise do produto de reacção na presença de base forte, para formar o composto L.

4. Método para preparar um mono-hidrato da estrutura M''



o qual compreende tratar uma base livre da estrutura



com água, para formar o mono-hidrato M''

Lisboa, 18 de Dezembro de 2014