

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 363**

51 Int. Cl.:

C07C 227/06 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C07C 229/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2017 PCT/IB2017/058203**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18116203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2017 E 17832992 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021 EP 3558930**

54 Título: **Proceso nuevo para intermedios iniciales de sacubitrilo**

30 Prioridad:

23.12.2016 WO PCT/CN2016/111674

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2021

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KLEINBECK-RINIKER, FLORIAN KARL;
KAPFERER, TOBIAS;
LAUMEN, KURT;
RUCH, THOMAS;
SCHLAMA, THIERRY;
KU, JIE;
LI, YUNZHONG;
PENG, WEI;
YANG, YAO y
KIM, HONGYONG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 883 363 T3

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

DESCRIPCIÓN

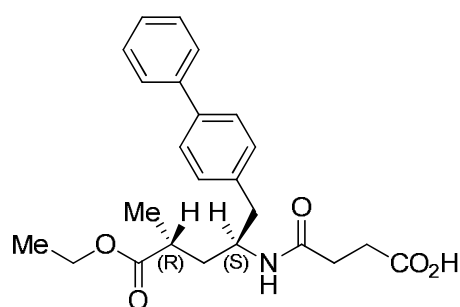
Proceso nuevo para intermedios iniciales de sacubitrilo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una ruta de síntesis química nueva para intermedios útiles en la preparación de inhibidores de neprilisina (NEP) y sus profármacos, en particular para el profármaco inhibidor de NEP sacubitrilo.

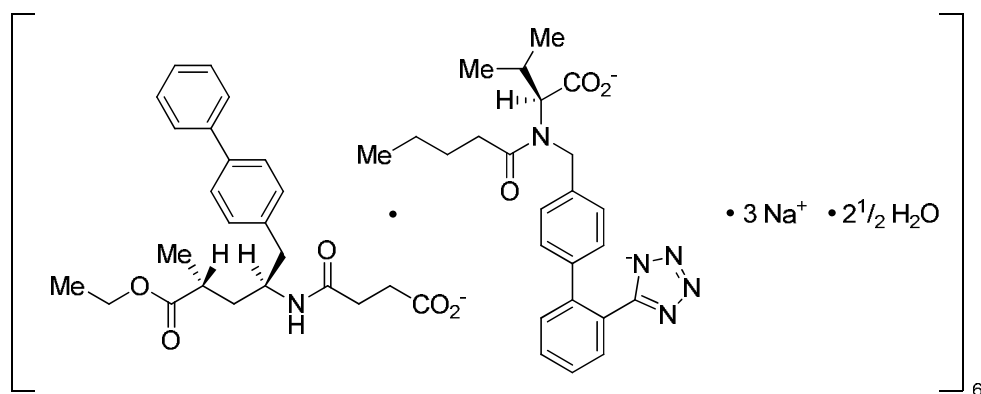
10 Antecedentes de la invención

El profármaco inhibidor de NEP sacubitrilo (éster etílico del ácido *N*-(3-carboxil-1-oxopropil)-(4*S*)-(p-fenilfenilmetil)-4-amino-(2*R*)-metilbutanoico; nombre según la IUPAC ácido 4-[[[(1*S*,3*R*)-1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-4-etoxi-3-metil-4-oxobutil]amino]-4-oxobutanoico, también conocido como AHU377) se representa mediante la siguiente fórmula (A)



(A)

El sacubitrilo, junto con el valsartán, un bloqueador conocido de los receptores de la angiotensina (ARB), forma un complejo de hidrato de sal de sodio, conocido como LCZ696, que comprende las formas aniónicas de sacubitrilo y valsartán, cationes de sodio y moléculas de agua en una relación molar de 1:1:3:2,5, respectivamente (relación de 6:6:18:15 en la celda unitaria asimétrica del cristal en estado sólido) (WO 2007/056546), y que está presente esquemáticamente en la fórmula (B).



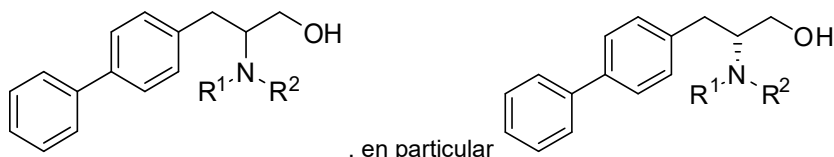
(B)

También se hace referencia a dicho complejo con los siguientes nombres químicos: [3-((1*S*,3*R*)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxycarbonil-1-butylcarbamoil)propionato-(*S*)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato] de trisodio hemipentahidratado o hexakis(4-[[[(1*S*,3*R*)-1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-4-etoxi-3-metil-4-oxobutil]amino]-4-oxobutanoato) hexakis(*N*-pentanoil-*N*-[2'-(1*H*-tetrazol-1-id-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil)-*L*-valinato) de octadecasodio-agua (1/15) (nomenclatura de la IUPAC).

LCZ696 actúa como inhibidor de la neprilisina y de los receptores de la angiotensina (ARNI) y, por lo tanto, es útil particularmente en el tratamiento de la hipertensión o insuficiencia cardíaca crónica. Su utilidad ha sido confirmada mediante ensayos clínicos, por ejemplo, en el ensayo PARADIGM-HF que marcó precedente. Paralelamente, el 7 de julio de 2015, la FDA aprobó LCZ696 para su comercialización.

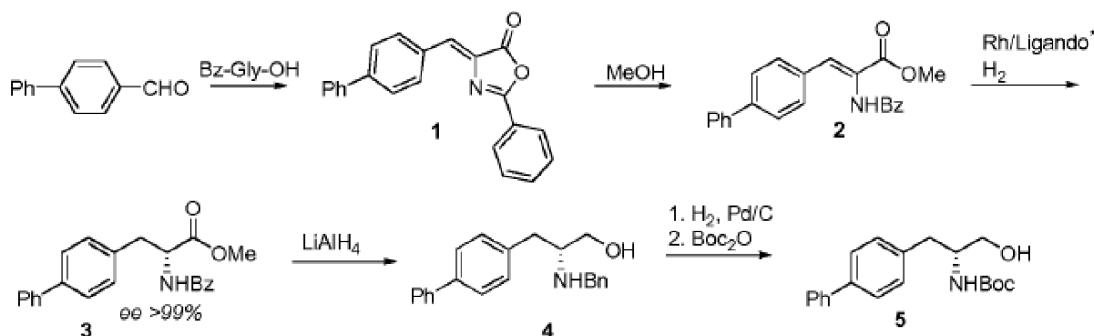
Las rutas de síntesis química para preparar inhibidores de NEP y sus profármacos, en particular sacubitrilo, y sus precursores se han descrito previamente, por ejemplo, en Ksander. *et al. J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1689-1700; en la patente de EE. UU. N.º 5 217 996 y en las solicitudes de patente internacional WO 2007/083774, WO 2007/083776, WO 2008/031567, WO 2008/083967, WO 2008/120567 WO 2009/090251, WO 2010/081410, WO 2011/035569, WO 2011/088797, WO 2012/025501, WO 2012/025502, WO 2013/026773, WO 2014/032627, WO 2015/024991 y WO 2015/037460, así como en las solicitudes de patente CN CN101362708, CN102260177, CN103483201, CN104557600, CN104725256, CN104725279, CN105017082, CN105061263, CN105085322, CN105152980, CN105168205, CN105198775, CN105237560, CN105330569, CN105481622, CN105566194, CN105601524 y CN105884656.

- 10 En particular, CN101362708, WO 2013/026773, WO 2014/032627, WO 2015/024991 y CN105884656 tratan sobre nuevos métodos de síntesis para proporcionar el compuesto precursor.



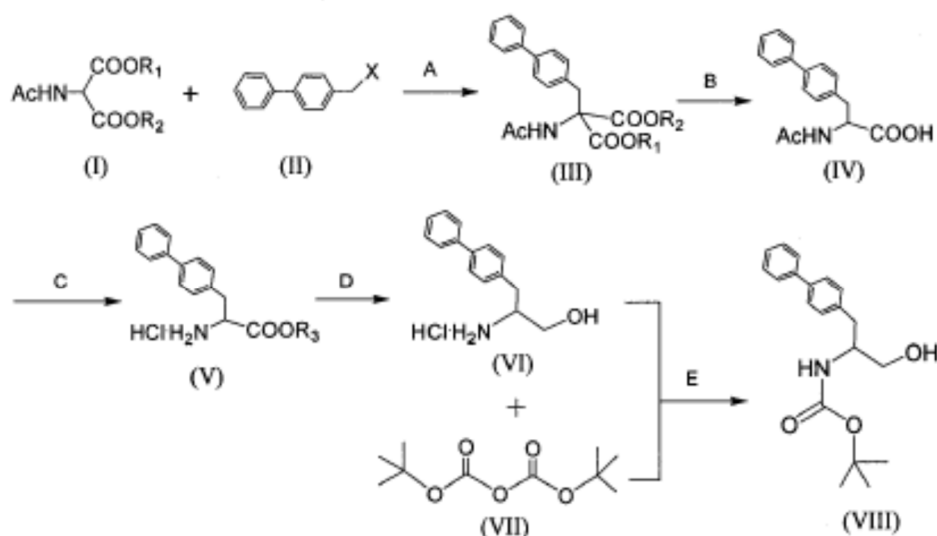
- 15 donde R1 y R2 son independientemente entre sí hidrógeno o un grupo protector de nitrógeno.

El proceso divulgado en el documento WO 2013/026773 se representa en el siguiente esquema

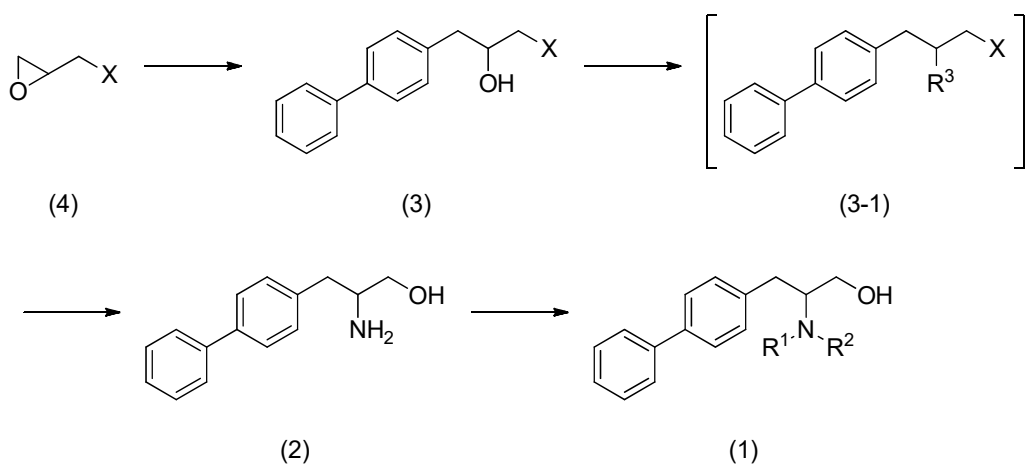


20

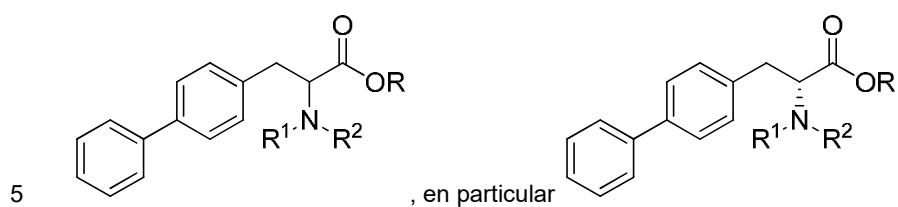
El proceso divulgado en el documento CN101362708 se representa en el siguiente esquema



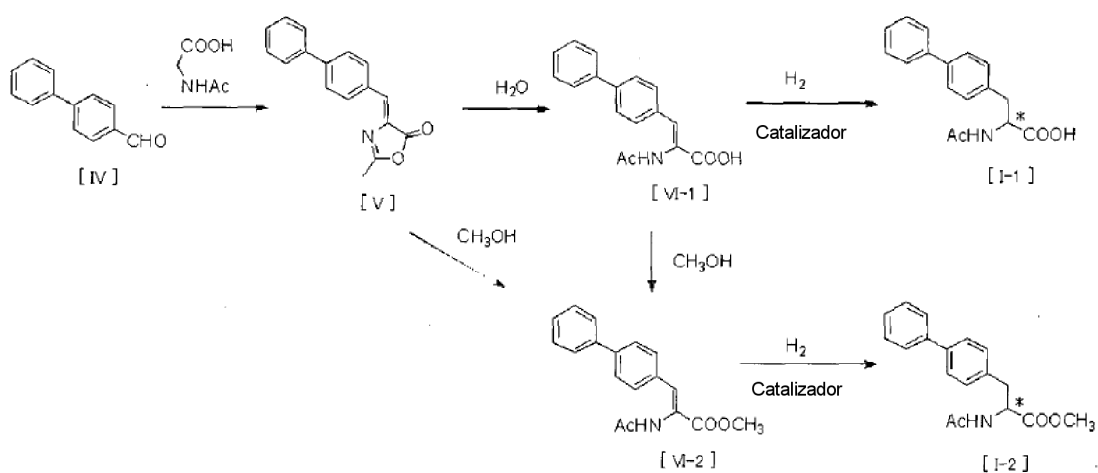
- 25 El proceso divulgado en el documento WO 2014/032627 se representa en el siguiente esquema



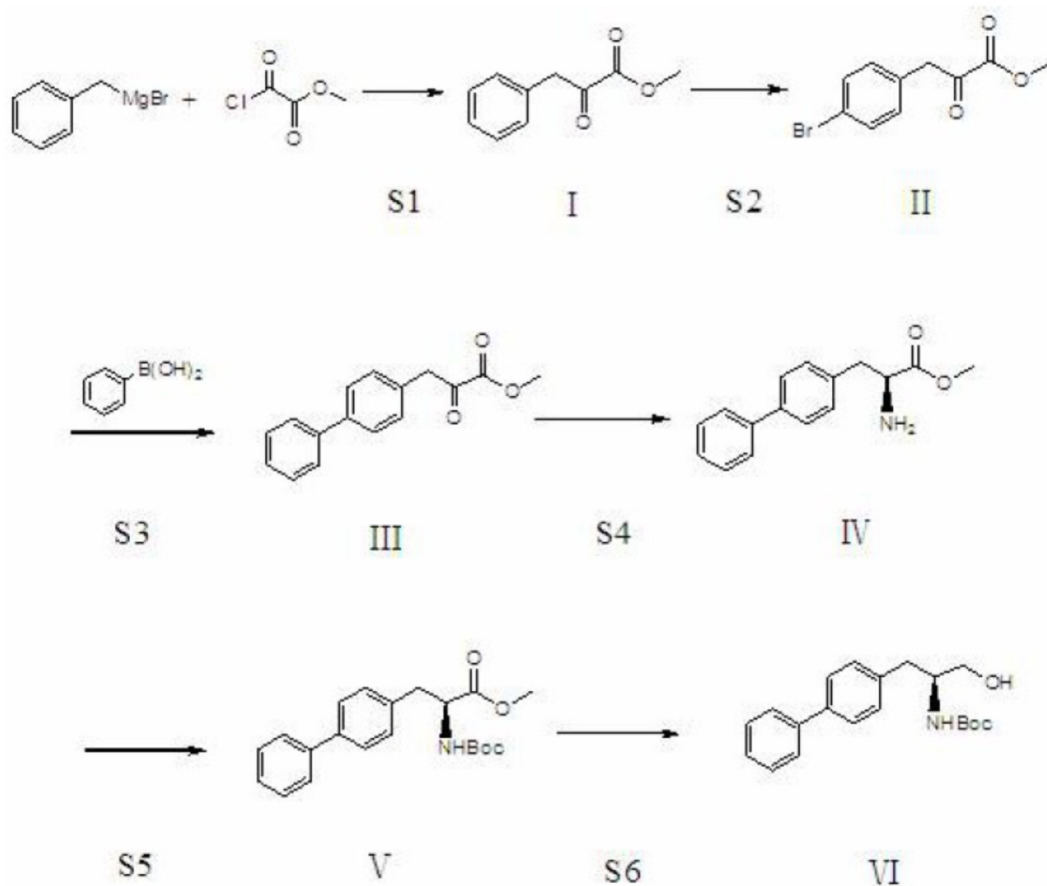
Además, el documento WO 2015/037460 divulga un proceso para obtener un intermedio previo, a saber



mediante un proceso tal como se indica a continuación:



El proceso divulgado en el documento CN105884656 se representa en el siguiente esquema

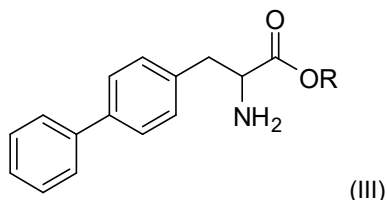


Sin embargo, estos procesos siguen presentando desventajas tales como reactivos potencialmente peligrosos o el uso de catalizadores costosos desde el punto de vista económico y/o una estereoselectividad limitada. Por lo tanto, sigue siendo necesario diseñar procesos químicos que proporcionen formas baratas para acceder a dichos materiales de partida para la síntesis de sacubitrilo que sean adecuados para la producción a escala industrial en condiciones favorables desde el punto de vista económico y medioambiental, y que proporcionen tales precursores de las sustancias farmacológicas con una pureza química elevada y con una selectividad estereoquímica elevada.

SUMARIO DE LA INVENCION

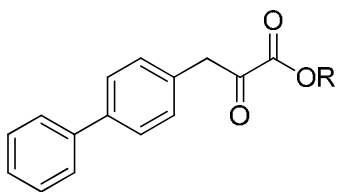
La invención se refiere a un proceso novedoso para la fabricación de un compuesto de fórmula (III), especialmente (III-a) que se representa a continuación, que incluye los pasos del proceso para la fabricación del aducto así como otros pasos del proceso que dan como resultado la fabricación de sacubitrilo.

Por consiguiente, **en un primer aspecto**, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula (III), o una sal de este



donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

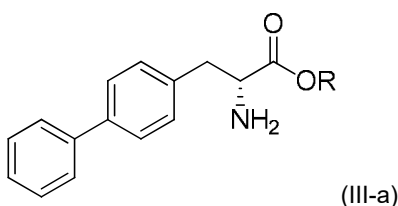
que comprende convertir un compuesto de fórmula (IV), o una sal de este,



donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

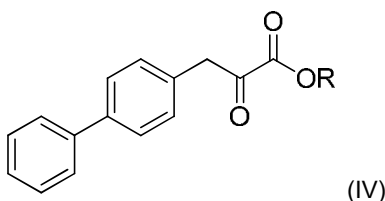
5 en el compuesto de fórmula (III) poniéndolo en contacto con una ω -transaminasa en presencia de un dador de amina aquiral, donde la tasa de conversión del compuesto de fórmula (IV) en el compuesto de fórmula (III) es superior a un 50 %.

10 En una realización de este, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

15 que comprende convertir un compuesto de fórmula (IV), o una sal de este,



20 donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

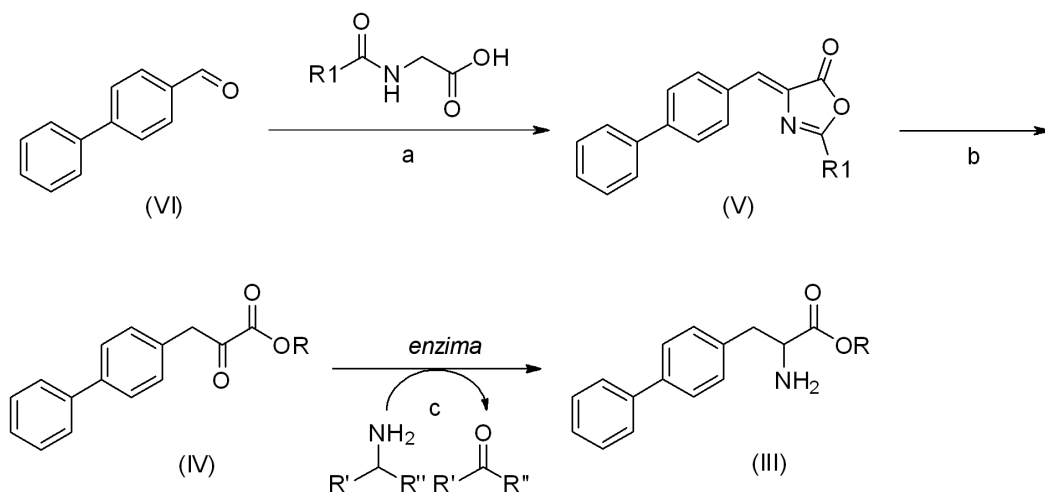
en el compuesto de fórmula (III-a) poniéndolo en contacto con una ω -transaminasa selectiva para (R) en presencia de un dador de amina de fórmula general $R'R''CH-NH_2$, preferentemente un dador de amina aquiral, y una coenzima, donde la tasa de conversión del compuesto de fórmula (IV) en el compuesto de fórmula (III-a) es superior a un 50 %.

25 Otras realizaciones se refieren a las condiciones de reacción particulares de este paso de reacción, así como a los pasos del proceso asociados para producir el compuesto de partida de fórmula (IV) y/o hacer reaccionar adicionalmente el compuesto obtenido de fórmula (III) y (III-a), respectivamente, para obtener finalmente el compuesto inhibidor de NEP sacubitrilo.

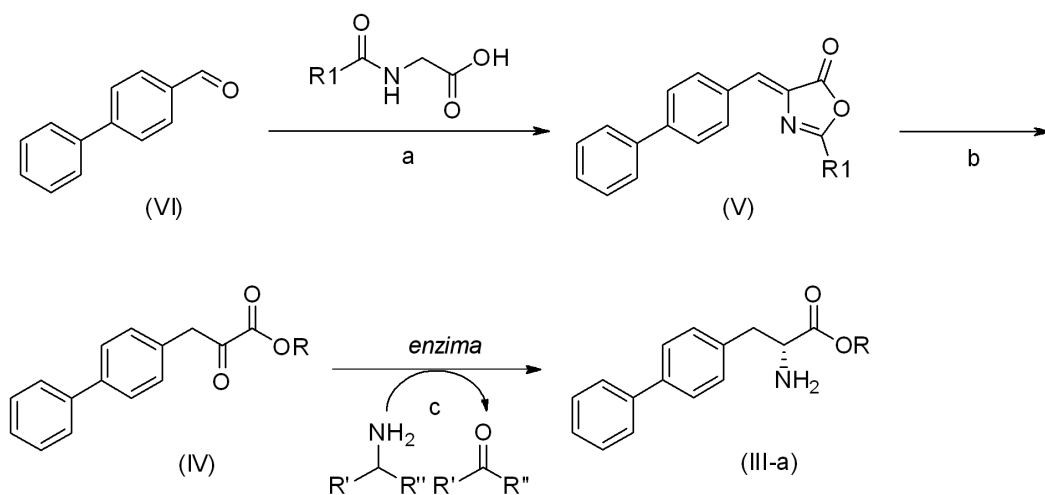
30 La secuencia de reacción que incluye el paso clave del proceso **c** que implica la transaminación de un compuesto de fórmula (IV) para obtener un compuesto de fórmula (III) y de fórmula (III-a), respectivamente, se representa en el siguiente ESQUEMA 1 y ESQUEMA 1-a, respectivamente:

35

ESQUEMA 1



ESQUEMA 1-a



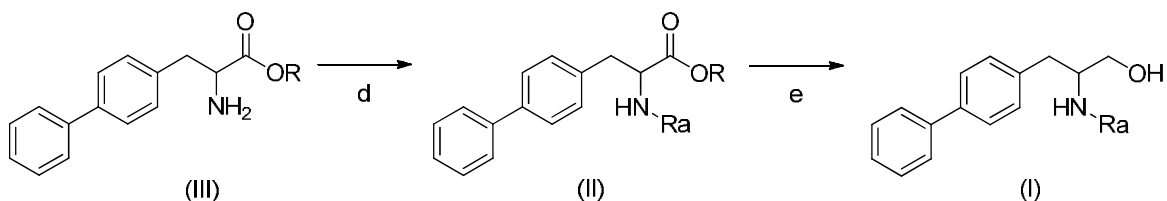
5

donde tanto en el ESQUEMA 1 como en el ESQUEMA 1-a, R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido y R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo.

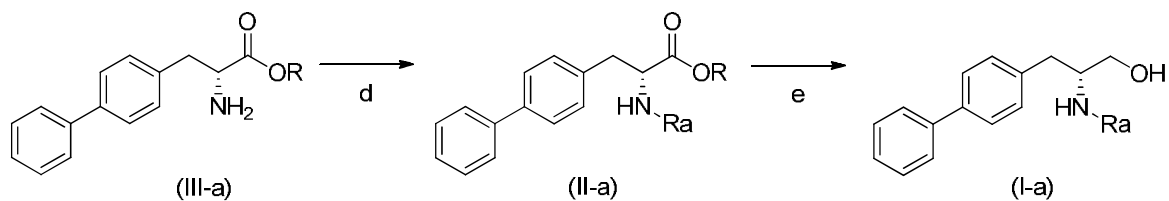
10 A continuación, el compuesto de fórmula (III) y (III-a), respectivamente, se puede transformar en un compuesto de fórmula (I) y (Ia), respectivamente, mediante las siguientes secuencias de reacción alternativas representadas en el ESQUEMA 2, 2* y 2** y el ESQUEMA 2-a, 2*-a y 2**-a, respectivamente:

ESQUEMA 2

15

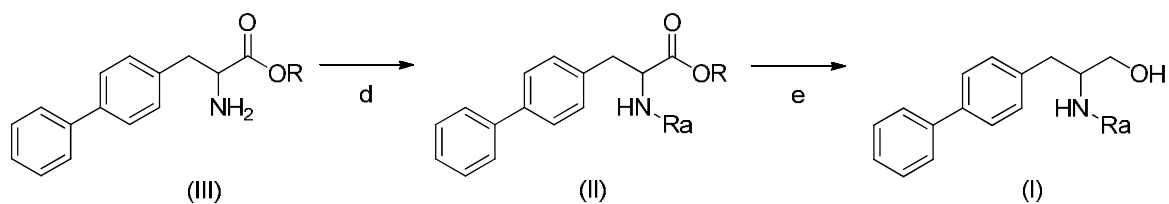


ESQUEMA 2-a



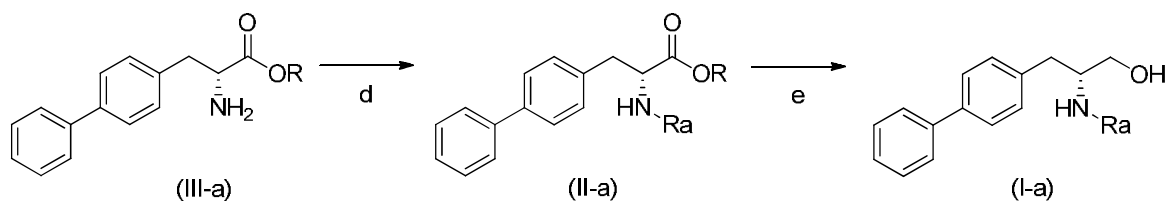
5 donde tanto en el ESQUEMA 2 como en el ESQUEMA 2-a, R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo y Ra es un grupo protector de nitrógeno.

ESQUEMA 2*



10

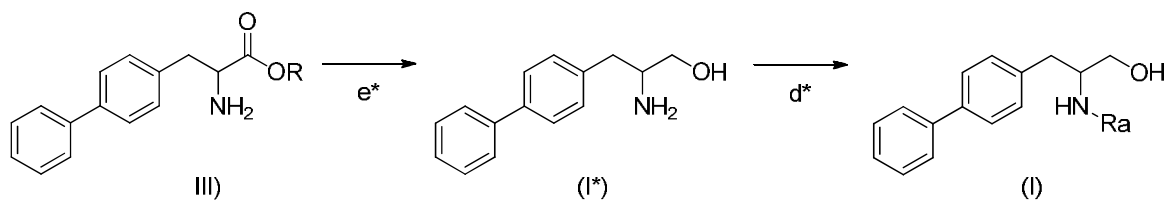
ESQUEMA 2*-a



15

donde tanto en el ESQUEMA 2* como en el ESQUEMA 2*-a, R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido y Ra es un grupo protector de nitrógeno.

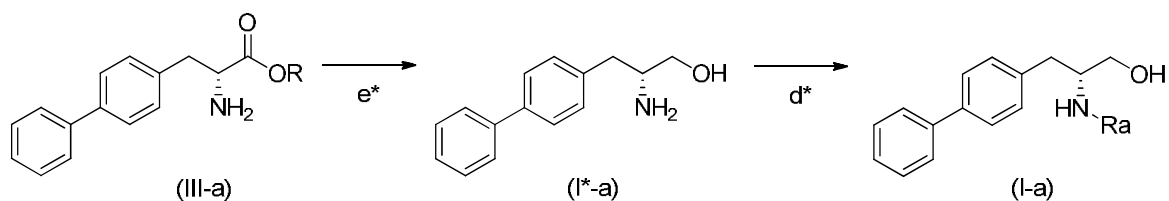
ESQUEMA 2**:



20

(

ESQUEMA 2** -a:



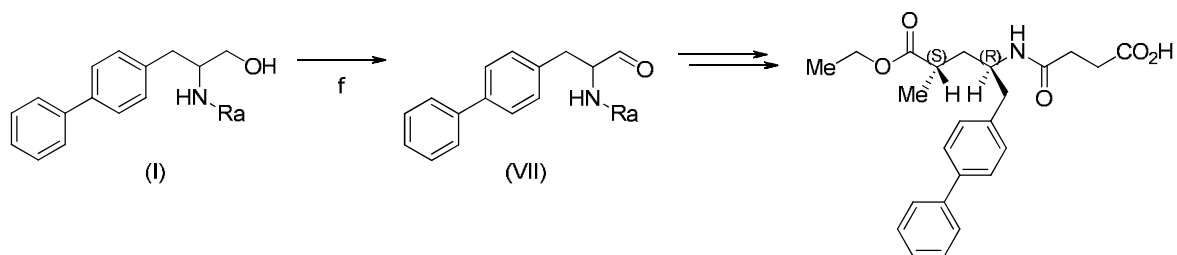
donde tanto en el ESQUEMA 2** como en el ESQUEMA 2** -a, R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo y Ra es un grupo protector de nitrógeno.

5

A continuación, el compuesto obtenido de fórmula (I) y (Ia), respectivamente, se puede transformar en el compuesto inhibidor de NEP sacubitrilo mediante pasos de reacción conocidos tal como se representan en el ESQUEMA 3 y el ESQUEMA 3-a, respectivamente:

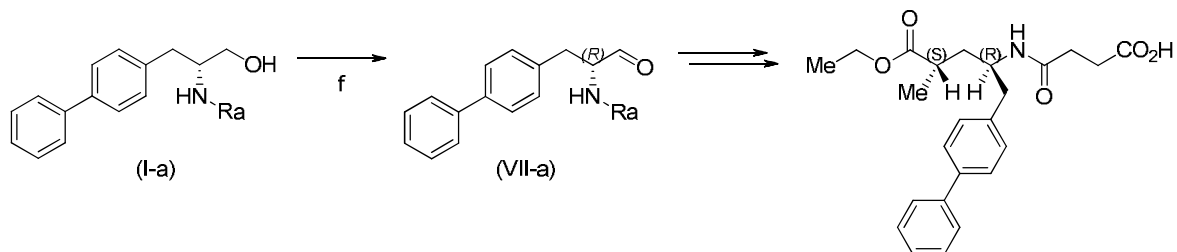
10

ESQUEMA 3



ESQUEMA 3-a:

15

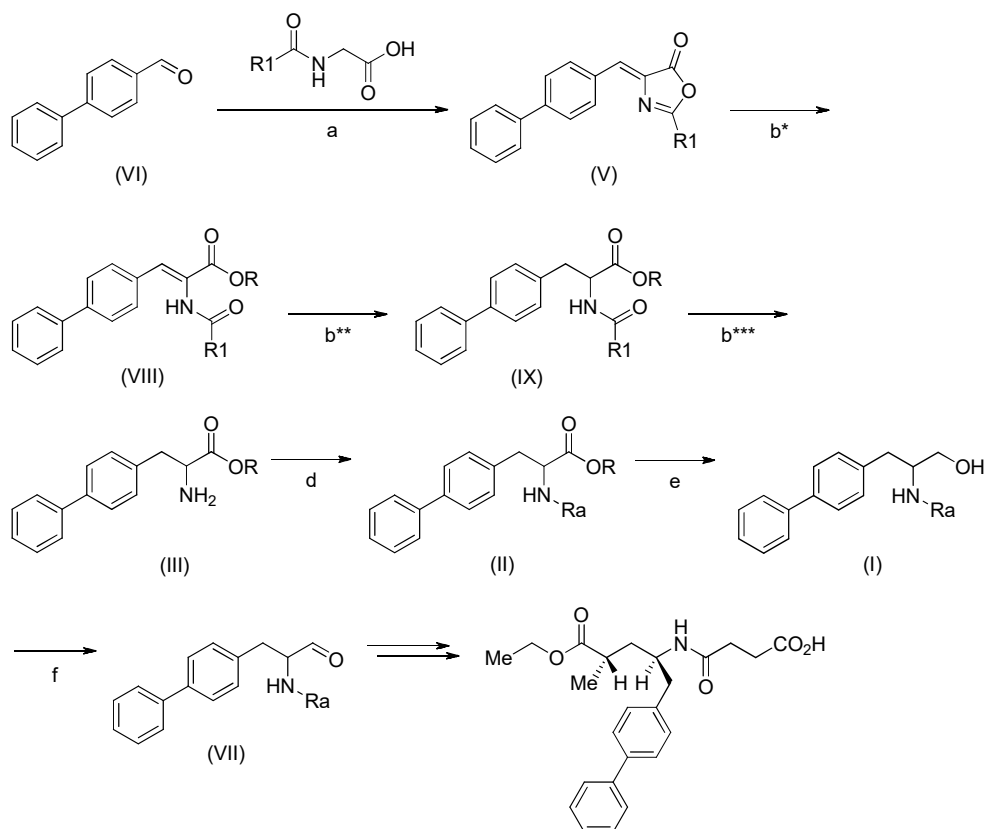


donde tanto en el ESQUEMA 3 como en el ESQUEMA 3-a, Ra es un grupo protector de nitrógeno.

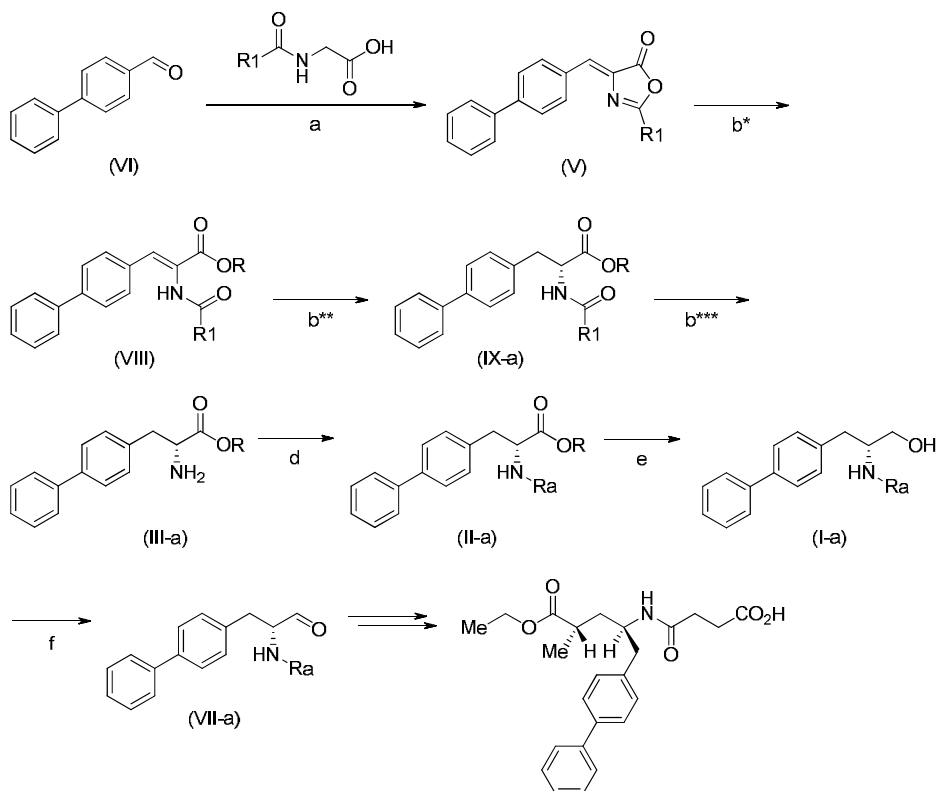
20

Además, **en un segundo aspecto**, la presente invención se refiere a un proceso de acuerdo con el siguiente ESQUEMA 4 y ESQUEMA 4-a:

ESQUEMA 4



ESQUEMA 4-a



donde en ambos esquemas, los sustituyentes tienen los siguientes significados: R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido y Ra es un grupo protector de nitrógeno.

En sus aspectos mencionados anteriormente, que también se proporcionan con mayor detalle más adelante, la presente invención proporciona las siguientes ventajas: Las rutas de síntesis novedosas descritas son adecuadas para el procesamiento a escala industrial, de forma favorable desde el punto de vista económico y medioambiental. Los compuestos de fórmula (III), los cuales son intermedios deseados para la síntesis de sacubitrilo, se pueden producir con un rendimiento elevado y una estereoselectividad elevada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION



Términos y expresiones generales:



Las definiciones generales utilizadas anteriormente y más adelante, salvo que se defina de otra manera, tienen los siguientes significados, donde la sustitución de una o más o todas las expresiones o símbolos por las definiciones más específicas puede hacerse independientemente para cada realización de la invención y conduce a realizaciones más preferidas.


En los casos en los que se utiliza la forma en plural para compuestos, materiales de partida, intermedios, sales, preparados farmacéuticos, enfermedades, trastornos y similares, se pretende que esta signifique uno (preferido) o más compuestos, sales, preparados farmacéuticos, enfermedades, trastornos o similares individuales, cuando se utiliza el singular o el artículo indefinido («un», «una»), no se pretende que este excluya el plural, sino que preferentemente solo signifique «uno(a)».


Compuestos quirales

El término «quiral» se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse con su imagen especular, mientras que el término «aquiral» se refiere a moléculas que se pueden superponer con su imagen especular.

En las fórmulas de la presente solicitud, el término «» en un C-sp³ representa un enlace covalente, donde la estereoquímica del enlace no está definida. Esto significa que el término «» en un C-sp³ comprende una configuración (S), así como una configuración (R) del centro quiral respectivo. Además, en la presente invención también se engloban mezclas, por ejemplo, mezclas de enantiómeros tales como racematos. Se prefieren especialmente estereoisómeros individuales de los compuestos de la fórmula (1) o (2), especialmente los específicos de fórmula (1-a) y (1-b).

En las fórmulas de la presente solicitud, el término «» en un C-sp² representa un enlace covalente, donde la estereoquímica o la geometría del enlace no está definida. Esto significa que el término «» en un C-sp² comprende una configuración (Z), así como una configuración (E) del doble enlace respectivo. Además, en la presente invención también se engloban mezclas, por ejemplo, mezclas de isómeros de dobles enlaces.

En las fórmulas de la presente solicitud, el término «» en un C-sp³ indica la estereoquímica absoluta, ya sea (R) o (S).

En las fórmulas de la presente solicitud, el término «» en un C-sp³ indica la estereoquímica absoluta, ya sea (R) o (S).

En las fórmulas de la presente solicitud, el término «» indica un enlace C-sp³-C-sp³ o un enlace C-sp²-C-sp².

Los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centros asimétricos. Las configuraciones absolutas preferidas son las que se indican específicamente en la presente. Sin embargo, en la presente invención se engloba cualquier posible enantiómero puro, diastereoisómero puro, o mezclas de estos, por ejemplo, mezclas de enantiómeros, tales como racematos.

Los compuestos con un centro estereogénico pero sin indicación de una configuración específica se consideran mezclas de compuestos con las configuraciones respectivas, por ejemplo, R,R; R,S; S,R y SS, o enantiómeros/diastereómeros puros.

La pureza estereoisomérica, especialmente enantiomérica, se menciona haciendo referencia a todos los diastereómeros del compuesto considerados conjuntamente (100 %). Se determina mediante cromatografía quiral (ejemplos incluyen HPLC, uPLC y GC) o RMN (con la adición de entidades quirales y/o metales).

- 5 La expresión compuesto "en esencia ópticamente puro", tal como se define en la presente, se refiere a un compuesto obtenido mediante un proceso de acuerdo con la invención donde el compuesto tiene una pureza óptica de al menos un 70 % (ee = exceso enantiomérico), más preferentemente de al menos un 90 % (ee) y de la forma más preferida de al menos un 95 % (ee) o superior, tal como un 100 % (ee).

10 Profármacos

El término «profármaco», tal como se utiliza en la presente, representa, en particular, compuestos que se transforman *in vivo* en el compuesto original, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre, por ejemplo, tal como se describe en T. Higuchi y V. Stella, «Pro-drugs as Novel Delivery Systems», volumen 14 de la serie de congresos de la ACS; Edward B. Roche, editor, «Bioreversible Carriers in Drug Design», American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987; H Bundgaard, editor, «Design of Prodrugs», Elsevier, 1985; Judkins *et al.* *Synthetic Communications* **1996**, 26, 4351-4367, y «The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action», segunda edición, R. B. Silverman (en particular el capítulo 8, páginas 497-557), Elsevier Academic Press, 2004.

- 20 Por lo tanto, los profármacos incluyen fármacos que tienen un grupo funcional que ha sido transformado en un derivado reversible de este. Habitualmente, tales profármacos se transforman en el fármaco activo mediante hidrólisis. Se pueden mencionar como ejemplos los siguientes:

Grupo Funcional		Derivado reversible
Ácido carboxílico		Ésteres, que incluyen, por ejemplo, ésteres alquílicos
Alcohol		Ésteres, que incluyen, por ejemplo, sulfatos y fosfatos, así como ésteres de ácidos carboxílicos.
Amina		Amidas, carbamatos, iminas, enaminas
Carbonilo (aldehído, cetona)		Iminas, oximas, acetales/cetales, ésteres enólicos, oxazolidinas y tiazoxolidinas

25

Los profármacos también incluyen compuestos que se pueden convertir en el fármaco activo mediante una reacción oxidativa o reductora. Se pueden mencionar como ejemplos:

30 **Activación oxidativa**

- N- y O-desalquilación
-
- Desaminación oxidativa
-
- N-oxidación
-
- Epoxidación
-

40 **Activación reductora**

- Reducción de azo
-
- Reducción de sulfóxido
-
- Reducción de disulfuro
-
- Alquilación biorreductora
-
- Reducción de nitro
-

50

Inhibidor de NEP

La expresión «inhibidor de NEP» describe un compuesto que inhibe la actividad de la enzima endopeptidasa neutra (NEP, EC 3.4.24.11).

55

En la presente invención las expresiones «inhibidor de NEP» o «profármaco inhibidor de NEP» se refieren a las sustancias como tales o a sales de estas, preferentemente sales farmacéuticamente aceptables de estas. Algunos ejemplos son sales de sodio, potasio, magnesio, calcio o amonio. Se prefieren las sales de calcio.

- 5 El profármaco inhibidor de NEP éster etílico del ácido *N*-(3-carboxi-1-oxopropil)-(4*S*)-*p*-fenilfenilmetil)-4-amino-(2*R*)-metilbutanoico, se puede hacer reaccionar opcionalmente de forma adicional para obtener el inhibidor de NEP activo ácido *N*-(3-carboxi-1-oxopropil)-(4*S*)-*p*-fenilfenilmetil)-4-amino-(2*R*)-metilbutanoico, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Transaminasa:

10

En el contexto de la presente invención, una transaminasa es una enzima dependiente de piridoxal-fosfato que cataliza la transferencia de un grupo amino (NH₂) de una amina primaria a un grupo carbonilo (C=O) de una molécula aceptora. Las transaminasas se clasifican en E.C. 2.6.1.X. En una realización particularmente preferida de la presente invención, la transaminasa es una transaminasa selectiva para (*R*) o (*S*), particularmente es, en una realización preferida, una ω-transaminasa, en particular, una ω-transaminasa selectiva para (*R*).

15

En el contexto de la presente invención, una ω-transaminasa es preferentemente una enzima con el código de clasificación E.C.2.6.1.18. Estas amino transaminasas se caracterizan por que utilizan principalmente aminas como sustratos. Estas enzimas se caracterizan, además, por exhibir una constante de equilibrio de reacciones catalizadas por ω-transaminasas que es superior a 1.

20

La presente invención también considera con el término transaminasa, en particular ω-transaminasa, un extracto de un organismo, tal como un microorganismo o una célula, que contiene una transaminasa, en particular una ω-transaminasa, o una célula o un microorganismo vivo o muerto que comprende en sí una transaminasa, en particular, una ω-transaminasa. Un microorganismo o célula o extracto o enzima transaminasa de este tipo se puede utilizar en forma inmovilizada o no inmovilizada.

25

La transaminasa, en particular la ω-transaminasa, puede ser también una transaminasa de origen natural producida de forma recombinante (de tipo natural) o modificada genéticamente, en particular una ω-transaminasa, que es codificada parcial o completamente por una secuencia de ácido nucleico o un derivado de esta contenida en uno de los organismos identificados anteriormente o que sea equivalente a esta.

30

Se describe una visión general reciente de las ω-transaminasas que se pueden utilizar y/u optimizar para ser utilizadas de acuerdo con la presente invención en, por ejemplo, Koszelewski *et al.*, *Trends in Biotechnology* **2010**, 28, 324-332 y Malik *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 94, 1163-1171. Tales transaminasas se pueden obtener, por ejemplo, a partir de microorganismos tales como *Chromobacterium violaceum*, *Vibrio fluvialis*, *Alcaligenes denitrificans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus thuringiensis* y otros.

35

En una realización, las ω-transaminasas utilizadas en la presente invención se obtuvieron de Codexis Inc. con los números de referencia ATA-013, ATA-015, ATA-016, ATA-25, ATA-032, ATA-033, ATA-036, ATA-301, ATA-303, ATA-412, ATA-415, ATA-417 y ATA-436 (ya sea como parte del kit de cribado Codex® ATA o como variantes adicionales de ω-transaminasas modificadas genéticamente, también obtenidas de Codexis Inc.). Tales ω-transaminasas modificadas genéticamente se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 9 889 380, 8 293 507 y 9 133 445, la patente EP N.º EP2401366 y la solicitud de PCT WO 2010/099501.

40

Coenzima

Las transaminasas requieren la coenzima piridoxal-5'-fosfato (PLP). Las expresiones «piridoxal-fosfato», «PLP», «piridoxal-5'-fosfato», «PYP» y «P5P» se utilizan indistintamente en la presente para referirse al compuesto que actúa como una coenzima en reacciones de transaminasas.

50

En algunas realizaciones, el piridoxal-fosfato se define mediante la estructura del ácido 1-(4'-formil-3'-hidroxi-2'-metil-5'-piridil)metoxifosfónico, número de CAS [54-47-7], el piridoxal-5'-fosfato se puede producir *in vivo* mediante la fosforilación y oxidación del piridoxol (también conocido como vitamina B6). En las reacciones de transaminación que utilizan enzimas transaminasa, el grupo amina del dador de amino se transfiere a la coenzima para producir un subproducto ceto, mientras que el piridoxal-5'-fosfato se convierte en fosfato de piridoxamina. El piridoxal-5'-fosfato se regenera mediante la reacción con un compuesto ceto diferente (el aceptor de amino). La transferencia del grupo amina desde el fosfato de piridoxamina al aceptor de amino produce una amina quiral y regenera la coenzima.

55

En algunas realizaciones, el piridoxal-5'-fosfato puede ser reemplazado por otros miembros de la familia de vitaminas B6, que incluyen piridoxina (PN), piridoxal (PL), piridoxamina (PM) y sus homólogos fosforilados, fosfato de piridoxina (PNP) y fosfato de piridoxamina (PMP).

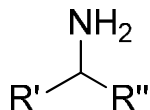
60

65

Dador de amina

En el contexto de la presente invención, un dador de amina es una molécula capaz de proporcionar un grupo amino a un aceptor de amina utilizando una transaminasa, en particular una ω -transaminasa. En una realización preferida particular, el dador de amina es una amina o un aminoácido.

- 5 En algunas realizaciones, los dadores de amino son moléculas con la siguiente fórmula general,



10 donde cada uno de los grupos R' y R'', cuando se considera independientemente, es un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, que no está sustituido o que está sustituido con uno o más grupos no inhibidores enzimáticamente. R' puede ser igual o diferente de R'' en cuanto a su estructura o quiralidad. En algunas realizaciones, R' y R'', considerados conjuntamente, pueden formar un anillo que no está sustituido, está sustituido o fusionado con otros anillos. Los dadores de amino habituales que se pueden utilizar incluyen aminoácidos quirales y aquirales, y aminas quirales y aquirales. Los dadores de amino habituales que se pueden utilizar incluyen, a modo de ejemplo y
15 sin limitación, isopropilamina (2-aminopropano), β -alanina, alanina, en particular D,L-alanina, L-alanina o D-alanina, α -metilbencilamina (α -MBA), glutamato, fenilalanina, glicina, 3-aminobutirato, 2-aminobutano, γ -aminobutirato y una sal, por ejemplo un cloruro, de cualquiera de estos. En una realización preferida de este, la isopropilamina (2-aminopropano) es el dador de amino.

20 En una realización de este tipo, el producto de tipo cetona obtenido será acetona, ácido fenilpirúvico o una sal de este, ácido pirúvico o una sal de este, ácido glioxílico o una sal de este, acetofenona, 2-cetoglutarato, 3-oxobutirato, 2-butanona, 3-oxopirrolidina (3-OP), 3-piridilmetilcetona (3-PMK), éster etílico del ácido 3-oxobutírico (3-OBEE), éster metílico del ácido 3-oxopentanoico (3-OPME), *N*-1-Boc-3-oxopiperidinona y *N*-1-Boc-3-oxopirrolidina (B3OP) o una sal, por ejemplo un cloruro, de cualquiera de estos. En una realización preferida de este, el producto de tipo cetona
25 obtenido es acetona.

Condiciones de la reacción enzimática:

30 Las «condiciones de reacción adecuadas» se refieren a aquellas condiciones en la solución de reacción catalizada por transaminasas (por ejemplo, intervalos de carga de enzima, carga de sustrato, carga de cofactor, temperatura, pH, tampones, codisolventes, etc.) en las que la transaminasa seleccionada es capaz de convertir un compuesto sustrato en un compuesto producto (por ejemplo, conversión del compuesto de fórmula (IV), preferentemente (IV-a), en el compuesto de fórmula (III), preferiblemente (III-a)). En la presente divulgación se proporcionan «condiciones de reacción adecuadas» ilustrativas y estas se ilustran mediante los Ejemplos.

35 La «carga», tal como en «carga de compuesto» o «carga de enzima» o «carga de cofactor», se refiere a la concentración o cantidad de un componente en una mezcla de reacción al inicio de la reacción.

40 El «sustrato» en el contexto del proceso de reacción catalizado por transaminasas se refiere al compuesto o la molécula sobre el que actúa la enzima. Por ejemplo, un sustrato ilustrativo para la transaminasa en el proceso divulgado en la presente es el compuesto (IV).

45 El «producto» en el contexto del proceso de reacción catalizado por transaminasas se refiere al compuesto o la molécula resultante de la acción de la enzima. Por ejemplo, un producto ilustrativo para la transaminasa en el proceso divulgado en la presente es el compuesto (III).

50 En el contexto de la presente invención, la reacción de la transaminasa es enantioselectiva, es decir, produce el enantiómero deseado en exceso respecto al enantiómero no deseado. En algunas realizaciones, el enantiómero deseado se forma con un exceso enantiomérico (ee) de al menos un 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior.

En la presente invención, se prefiere que el aceptor de amino se convierta en el compuesto de tipo amina quiral deseado con una tasa de conversión superior a un 50 %, o de al menos un 60, 70, 80, 90, 95, 99, en particular 100 %.

Definiciones de los sustituyentes

El término «alquilo» se define como un radical o parte de un radical como una cadena carbonada lineal o ramificada (una o, si se desea y es posible, más veces), y es especialmente alquilo C₁-C₇, preferentemente alquilo C₁-C₆, más preferentemente alquilo C₁-C₄.

Los términos «C₁-C₇», «C₁-C₆» y «C₁-C₄», respectivamente, definen un resto con hasta y que incluye como máximo 7, especialmente hasta y que incluye como máximo 6 y 4, respectivamente, átomos de carbono, estando dicho resto ramificado (una o más veces) o siendo de cadena lineal y estando unido a través de un carbono terminal o no terminal.

El cicloalquilo es, por ejemplo, cicloalquilo C₃-C₇ y es, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Se prefieren ciclopentilo y ciclohexilo.

El alcoxi es, por ejemplo, alcoxi C₁-C₇ y es, por ejemplo, metoxi, etoxi, *n*-propiloxi, isopropiloxi, *n*-butiloxi, isobutiloxi, *sec*-butiloxi, *tert*-butiloxi y también incluye los radicales correspondientes pentiloxi, hexiloxi y heptiloxi. Se prefiere alcoxi C₁-C₄.

El alcanoílo es, por ejemplo, alcanoílo C₂-C₈ y es, por ejemplo, acetilo [-C(=O)Me], propionilo, butirilo, isobutirilo o pivaloilo. Se prefiere alcanoílo C₂-C₅, especialmente acetilo.

El halo o halógeno es preferentemente fluoro, cloro, bromo o yodo, de la forma más preferida, cloro, bromo o yodo.

El halo-alquilo es, por ejemplo, halo-alquilo C₁-C₇ y es, en particular, halo-alquilo C₁-C₄, tal como trifluorometilo, 1,1,2-trifluoro-2-cloroetilo o clorometilo. El halo-alquilo C₁-C₇ preferido es trifluorometilo.

El alqueno puede ser un alquilo lineal o ramificado que contiene un doble enlace y que comprende preferentemente de 2 a 12 átomos de carbono, prefiriéndose especialmente de 2 a 10 átomos de carbono. Se prefiere particularmente un alqueno C₂-C₇ lineal, más preferentemente un alqueno C₂-C₄. Algunos ejemplos de grupos alquilo son etilo y los isómeros de propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo y eicosilo, cada uno de los cuales contiene un doble enlace. Se prefiere especialmente alilo.

El alqueno es un radical bivalente derivado de alquilo C₁₋₇ y es especialmente alqueno C₂-C₇ o alqueno C₂-C₇ y, opcionalmente, puede estar interrumpido por uno o más, por ejemplo, hasta tres restos de oxígeno, NR₁₄ o azufre, donde R₁₄ es alquilo, cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido, con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre, por ejemplo, alquilo C₁-C₇, (alcoxi C₁-C₇)-(alquilo C₁-C₇) o alcoxi C₁-C₇.

El alqueno es un radical bivalente derivado de alqueno C₂₋₇ y puede estar interrumpido por uno o más, por ejemplo, hasta tres restos de oxígeno, NR₁₄ o azufre, donde R₁₄ es alquilo, y está no sustituido o sustituido con uno o más, por ejemplo, hasta tres sustituyentes, preferentemente seleccionados independientemente entre los sustituyentes mencionados anteriormente para el alqueno.

El arilo, que constituye un radical o parte de un radical, es, por ejemplo, arilo C₆₋₁₀ y es preferentemente un resto de arilo mono- o policíclico, especialmente monocíclico, bicíclico o tricíclico con de 6 a 10 átomos de carbono, tal como fenilo, naftilo o fluorenilo, preferentemente fenilo, y que puede estar no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes, seleccionados independientemente entre, por ejemplo, alquilo C₁-C₇, (alcoxi C₁-C₇)-(alquilo C₁-C₇) o alcoxi C₁-C₇.

El término arilalquilo se refiere a aril-(alquilo C₁-C₇), donde el arilo es tal como se define en la presente y es, por ejemplo, bencilo.

El término carboxilo se refiere a -CO₂H.

Ariloxi se refiere a un aril-O-, donde el arilo es tal como se ha definido anteriormente.

Un heterociclilo sustituido o no sustituido es un sistema anular mono- o policíclico, preferentemente mono-, bi- o tricíclico, de la forma más preferida monocíclico, insaturado, parcialmente saturado, saturado o aromático con preferentemente de 3 a 14 (más preferentemente de 5 a 14) átomos anulares y con uno o más, preferentemente de uno a cuatro, heteroátomos, seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno, azufre, S(=O)- o S(=O)₂, y no está sustituido o está sustituido con uno o más, por ejemplo, hasta tres sustituyentes, preferentemente seleccionados independientemente del grupo constituido por halo, alquilo C₁-C₇, halo-alquilo C₁-C₇, alcoxi C₁-C₇, halo-alcoxi C₁-C₇, tal como trifluorometoxi y (alcoxi C₁-C₇)-(alcoxi C₁-C₇). Cuando el heterociclilo es un sistema anular aromático, también se denomina heteroarilo. El heterociclilo es preferentemente imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, piridinilo, piranilo, diazionilo, oxazinilo, tiazinilo, dioxinilo, ditiinilo, azepanilo, tiepanilo, indolilo, isoindolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzazepinilo, carbazolilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, tiazolidilo, dioxolanilo, ditiolanilo, furazanilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, ditiazolilo, tetrazolilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, oxotiomorfolinilo, dioxotiomorfolinilo, dioxanilo, ditiinilo, azepanilo, oxepanilo, tiepanilo, o variantes benzofusionadas de estos.

En el heterocicilalquilo, el heterociclilo es preferentemente tal como se acaba de definir y está unido a un alquilo tal como se define para alquilo. Algunos ejemplos son imidazolimetilo, piridilmetilo o piperidinilmetilo.

El acetilo es $-C(=O)(\text{alquilo } C_1-C_7)$, preferentemente $-C(=O)Me$.

El sulfonilo es alquilsulfonilo C_1-C_7 (sustituido o no sustituido), tal como metilsulfonilo, fenil- o naftil(alquilsulfonilo C_1-C_7) (sustituido o no sustituido) tal como fenilmetanosulfonilo, o fenil- o naftilsulfonilo (sustituido o no sustituido); donde, si hay más de un sustituyente presente, por ejemplo, de uno a tres sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan independientemente entre ciano, halo, halo-alquilo C_1-C_7 , halo-alquilo C_1-C_7 y alquilo C_1-C_7 . Se prefiere especialmente alquilsulfonilo C_1-C_7 , tal como metilsulfonilo, y (fenil- o naftil)(alquilsulfonilo C_1-C_7), tal como fenilmetanosulfonilo.

El sulfenilo es (aril C_6-10)-(alquilsulfenilo C_1-C_7) (sustituido o no sustituido) o arilsulfenilo C_6-10 (sustituido o no sustituido), donde, si hay más de un sustituyente presente, por ejemplo, de uno a cuatro sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan independientemente entre nitro, halo, halo-alquilo C_1-C_7 y alquilo C_1-C_7 .

La imida se refiere a un grupo funcional (sustituido o no sustituido) constituido por dos grupos acilo unidos a nitrógeno, preferentemente un grupo cíclico derivado de ácidos dicarboxílicos. Se prefiere especialmente succinimidilo derivado de ácido succínico o ftalimidilo derivado de ácido ftálico. El grupo imidilo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre, por ejemplo, alquilo C_1-C_7 , (alcoxi C_1-C_7)-(alquilo C_1-C_7), alcoxi C_1-C_7 o halo.

La azida se refiere a un grupo $-N=N^+=N^-$.

El sililo, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo de acuerdo con la fórmula $-SiR_{11}R_{12}R_{13}$, donde R_{11} , R_{12} y R_{13} son, independientemente entre sí, alquilo C_1-C_7 , arilo C_6-C_{10} o fenil-(alquilo C_1-C_4). Los ejemplos preferidos para R_{11} , R_{12} y R_{13} son metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo, fenilo o fenil-(alquilo C_{1-4}).

Sales

Las sales son especialmente sales farmacéuticamente aceptables o, en general, sales de cualquiera de los intermedios mencionados en la presente, excepto si las sales se excluyen por razones químicas que el experto comprenderá fácilmente. Se pueden formar cuando haya grupos formadores de sales presentes, tales como grupos de carácter ácido básico, que pueden existir en forma disociada al menos parcialmente, por ejemplo, en un intervalo de pH de 4 a 10 en soluciones acuosas, o se pueden aislar especialmente en forma sólida, especialmente cristalina.

Dichas sales se forman por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferentemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de los compuestos o cualquiera de los intermedios mencionados en la presente con un átomo de nitrógeno básico (por ejemplo, imino o amino), especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Son ácidos inorgánicos adecuados, por ejemplo, los ácidos halógeno tales como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Son ácidos orgánicos adecuados, por ejemplo, los ácidos carboxílicos, fosfónicos, sulfónicos o sulfámicos, por ejemplo, el ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, aminoácidos tales como el ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido benzoico, ácido metano- o etanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftalenodisulfónico, ácido *N*-ciclohexilsulfámico, ácido *N*-metil-, *N*-etil- o *N*-propilsulfámico, u otros ácidos orgánicos protónicos tales como el ácido ascórbico.

En presencia de radicales cargados negativamente, tales como carboxi o sulfo, las sales también se pueden formar con bases, por ejemplo, sales metálicas o de amonio, tales como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, o sales de amonio con amoniaco o aminas orgánicas adecuadas, tales como monoaminas terciarias, por ejemplo, trietilamina o tri(2-hidroxietil)amina, o bases heterocíclicas, por ejemplo, *N*-etilpiperidina o *N,N'*-dimetilpiperazina.

Cuando un grupo básico y un grupo ácido están presentes en la misma molécula, cualquiera de los intermedios mencionados en la presente también puede formar sales internas.

Con fines de aislamiento o purificación de cualquiera de los intermedios mencionados en la presente, también es posible utilizar sales que no sean farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, picratos o percloratos.

Teniendo en cuenta la estrecha relación entre los compuestos e intermedios en forma libre y en forma de sus sales, incluidas aquellas sales que pueden utilizarse como intermedios, por ejemplo, en la purificación o identificación de los compuestos o sales de estos, se debe entender que cualquier referencia a los «compuestos», «materiales de partida» e «intermedios» anteriormente y en lo sucesivo en la presente se refiere también a una o más sales de estos o una mezcla de un compuesto, intermedio o material de partida libre correspondiente y una o más sales de estos, cada uno de los cuales está destinado a incluir también cualquier solvato o sal de uno o más de estos, según sea apropiado y conveniente y si no se menciona explícitamente de otro modo. Pueden obtenerse diferentes formas cristalinas y entonces también se incluyen.

Grupos protectores de nitrógeno

La expresión «grupo protector de nitrógeno» (por ejemplo, Ra en esta divulgación) comprende cualquier grupo que sea capaz de proteger reversiblemente una funcionalidad de nitrógeno, preferentemente una funcionalidad de amina y/o amida. Preferentemente, el grupo protector de nitrógeno es un grupo protector de amina y/o un grupo protector de amida. Convencionalmente, se utilizan grupos protectores de nitrógeno adecuados, por ejemplo, en la química de péptidos y se describen, por ejemplo, en los capítulos relevantes de trabajos de referencia estándar, tales como J. F. W. McOmie, «Protective Groups in Organic Chemistry», Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en P. G. M. Wuts y T. W. Greene, «Greene's Protective Groups in Organic Synthesis», cuarta edición, Wiley, New Jersey, 2007, y «The Peptides»; volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, y «Methoden der organischen Chemie» (Métodos de química orgánica), Houben Weyl, cuarta edición, volumen 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Los grupos protectores de nitrógeno preferidos comprenden en general: alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C₁-C₄, más preferentemente alquilo C₁-C₂, de la forma más preferida alquilo C₁, alqueno C₂₋₄ sustituido o no sustituido, donde cada alquilo C₁-C₆ y alqueno C₂₋₄ está opcionalmente mono-, di- o trisustituido con trialkilsilil-(alcoxi C₁-C₇) (por ejemplo, trimetilsililetoxi), cicloalquilo, arilo, preferentemente fenilo, o un grupo heterocíclico, preferentemente pirrolidinilo, donde el grupo cicloalquilo, el anillo de arilo o el grupo heterocíclico no está sustituido o está sustituido con uno o más, por ejemplo, dos o tres residuos, por ejemplo, seleccionados del grupo constituido por alquilo C₁-C₇, hidroxilo, alcoxi C₁-C₇, alcanilo C₂-C₈, halógeno, nitro, ciano y CF₃; aril-(alcoxi C₁-C₂)carbonilo (preferentemente fenil(alcoxi C₁-C₂)carbonilo, por ejemplo, benciloxycarbonilo); (alqueno C₁-C₁₀)carbonilo; (alquil C₁₋₆)carbonilo (por ejemplo, acetilo o pivaloilo); (aril C₆₋₁₀)carbonilo (por ejemplo, benzoilo); (alcoxi C₁₋₆)carbonilo (por ejemplo, *tert*-butoxicarbonilo); (aril C₆₋₁₀)-(alcoxi C₁₋₆)carbonilo; alilo o cinamilo; sulfonilo o sulfenilo; un grupo succinimidilo, sililo sustituido, por ejemplo, trialkilsililo o trialkilsililo (por ejemplo, trietilsililo).

Los ejemplos de grupos protectores de nitrógeno preferidos son acetilo, benzoilo, bencilo, cumilo, benzhidrido, tritilo, benciloxycarbonilo (Cbz), 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), benciloximetilo (BOM), pivaloilo oximetilo (POM), tricloroetoxycarbonilo (Troc), 1-adamantilo oxycarbonilo (Adoc), alilo, aliloxycarbonilo, trimetilsililo, *tert*-butildimetilsililo (TBDMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), trimetilsililetoximetilo (SEM), *tert*-butoxicarbonilo (Boc), *tert*-butilo, 1-metil-1,1-dimetilbencilo, (fenil)metilbenceno, piridinilo y pivaloilo. Los grupos protectores de nitrógeno más preferidos son acetilo, bencilo, benciloxycarbonilo (Cbz), trietilsililo (TES), trimetilsililetoximetilo (SEM), *tert*-butoxicarbonilo (Boc), pirrolidinilmetilo y pivaloilo.

Algunos ejemplos de más grupos protectores de nitrógeno preferidos son grupos pivaloilo, pirrolidinilmetilo, *tert*-butoxicarbonilo, bencilo y sililo, en particular grupos sililo de acuerdo con el grupo de fórmula SiR₁₁R₁₂R₁₃, donde R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son, independientemente entre sí, alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o fenil-(alquilo C₁-C₄). Los ejemplos preferidos para R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo y fenilo.

Los ejemplos de los grupos protectores de nitrógeno más preferidos son *tert*-butoxicarbonilo (Boc), benzoilo, estirilo, 1-butenilo, bencilo, *p*-metoxibencilo (PMB) y pirrolidinilmetilo, en particular pivaloilo y *tert*-butoxicarbonilo (Boc).

En una realización, la expresión grupo protector de nitrógeno se refiere a un grupo que se selecciona del grupo constituido por

alquilo C₁-C₆, que no está sustituido o está mono-, di- o trisustituido con tri-(alquil C₁-C₆)-silil(alcoxi C₁-C₇), arilo C₆-C₁₀, o un grupo heterocíclico que es un sistema anular mono-, bi- o tricíclico con de 5 a 14 átomos anulares y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, S, S(O) o S(O)₂, donde el anillo de arilo o el grupo heterocíclico no está sustituido o está sustituido con uno, dos o tres residuos, seleccionados del grupo constituido por alquilo C₁-C₇, hidroxilo, alcoxi C₁-C₇, alcanilo C₂-C₈, halógeno, nitro, ciano y CF₃;

(aril C₆-C₁₀)-(alcoxi C₁-C₂)carbonilo; (alqueno C₁-C₁₀)carbonilo; (alquil C₁-C₆)carbonilo; (aril C₆-C₁₀)carbonilo; (alcoxi C₁-C₆)carbonilo; (aril C₆-C₁₀)-(alcoxi C₁-C₆)carbonilo; alilo; cinamilo; sulfonilo; sulfenilo; succinimidilo y sililo, donde cada grupo sililo es un grupo SiR₁₁R₁₂R₁₃, donde R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son, independientemente entre sí, alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o fenil-(alquilo C₁-C₄).

En general, en la presente solicitud, la expresión «grupo protector de nitrógeno» comprende cualquier grupo que sea capaz de proteger de forma reversible una funcionalidad de amina.

Si una realización requiere la eliminación del grupo protector de nitrógeno, tal como se ha definido anteriormente, la eliminación se puede llevar a cabo habitualmente utilizando métodos conocidos, por ejemplo, tal como se describe en las referencias citadas anteriormente. Preferentemente, el grupo protector de nitrógeno, tal como se ha definido anteriormente, se elimina utilizando condiciones de carácter ácido o básico. Algunos ejemplos de condiciones de carácter ácido son ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético, ácido sulfúrico. Algunos ejemplos de condiciones de carácter básico son hidróxido de litio, etóxido de sodio. Se pueden utilizar nucleófilos tales como borohidruro de sodio. En el

caso de *N*-bencilo como grupo protector de amino, este se puede eliminar mediante hidrogenación o mediante el uso de algunos agentes oxidantes adecuados, por ejemplo, nitrato de amonio cérico (CAN) o 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ).

5 Grupos protectores de carboxilo

Un grupo protector de carboxilo (por ejemplo, R en esta divulgación) puede ser cualquier grupo conocido en la técnica, especialmente alquilo C₁-C₆, por ejemplo, etilo, metilo, alilo o *tert*-butilo, o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₆), por ejemplo, bencilo, o un grupo sililo SiR₁₁R₁₂R₁₃, donde R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son, independientemente entre sí, alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o fenil-(alquilo C₁-C₄). Los ejemplos preferidos para R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo, fenilo o fenil-(alquilo C₁-C₄). Los grupos protectores de carboxilo propiamente dichos, sus reacciones de introducción y sus reacciones de eliminación se describen, por ejemplo, en trabajos de referencia estándar, tales como J. F. W. McOmie, «Protective Groups in Organic Chemistry», Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en T. W. Greene, «Protective Groups in Organic Synthesis», Tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, en «The Peptides»; Volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, en «Methoden der organischen Chemie» (Métodos de química orgánica), Houben Weyl, 4.^a edición, Volumen 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jescheit, «Aminosäuren, Peptide, Proteine» (Aminoácidos, péptidos, proteínas), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, y Basilea 1982, y en Jochen Lehmann, «Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate» (Química de carbohidratos: monosacáridos y derivados), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Por ejemplo, un grupo protector R* o Ra de tipo alquilo C₁-C₆, por ejemplo, etilo, se puede eliminar mediante hidrólisis, por ejemplo, en presencia de una base, tal como un hidróxido de un metal alcalino, por ejemplo, hidróxido de litio, en presencia de un disolvente adecuado, por ejemplo, un éter cíclico, tal como tetrahidrofurano, y agua, por ejemplo, a una temperatura comprendida en el intervalo de 0 a 50 °C, tal como de 10 a 30 °C.

En general, esto implica que siempre que se utilice la expresión «grupo protector» en la presente memoria descriptiva, un grupo protector solo se utilizará como tal si se elimina para el próximo producto - si se mantiene, el grupo protector se convertirá en un sustituyente. Por lo tanto, alquilo, tal como etilo, si se elimina, es un grupo protector, si se mantiene, se convierte en un resto permanente.

En los casos en los que se mencionan grupos protectores, es su característica el hecho de que, a diferencia de los grupos que se mantienen en una molécula, los grupos protectores se separan por escisión en un paso de reacción posterior; por lo tanto, alquilo, tal como etilo, como grupo protector, basado en esta función, debe distinguirse de alquilo, tal como etilo, que debe permanecer en un producto de reacción.

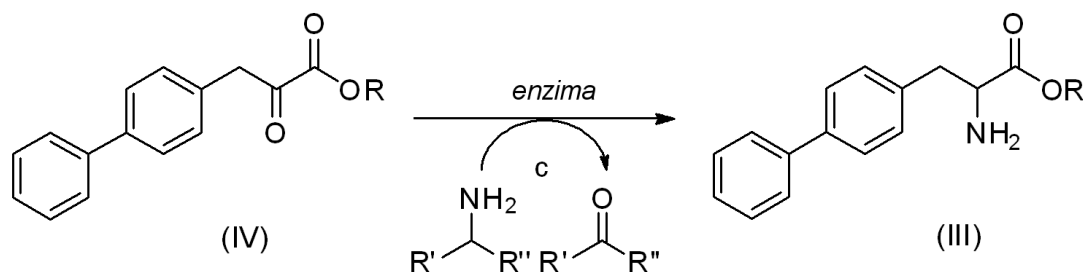
35 REALIZACIONES

Las siguientes secciones describen con más detalle, según sea necesario, los pasos individuales de los procesos tal como se exponen en los ESQUEMAS 1 a 4 anteriores y como se representan en las reivindicaciones.

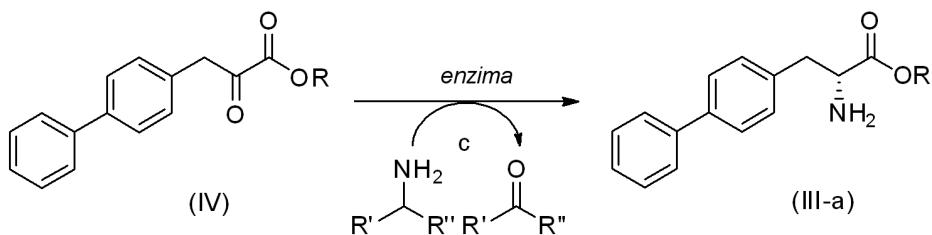
40 Reacciones de acuerdo con el ESQUEMA 1 y el ESQUEMA 1-a - paso c

En el primer aspecto de la presente invención, todas las realizaciones comprenden siempre necesariamente el paso c del proceso del ESQUEMA 1 y ESQUEMA 1-a, respectivamente:

45 ESQUEMA 1 - paso c

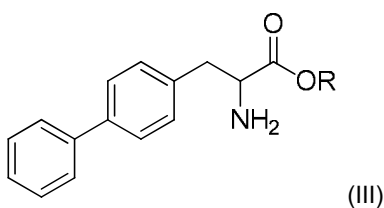


ESQUEMA 1-a - paso c

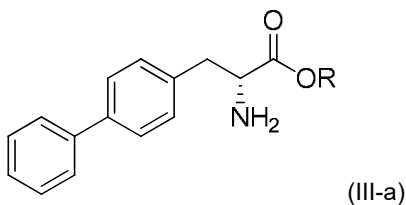


donde tanto en el ESQUEMA 1 como en el ESQUEMA 1-a, R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo.

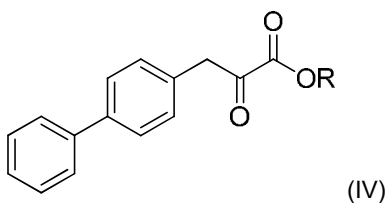
- 5 Por consiguiente, en este aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula (III), o una sal de este



- 10 preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



- 15 donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,
que comprende convertir un compuesto de fórmula (IV), o una sal de este,



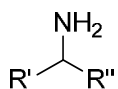
- 20 donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

en el compuesto de fórmula (III) poniéndolo en contacto con una ω -transaminasa selectiva para (R) en presencia de un dador de amina, donde la tasa de conversión del compuesto de fórmula (IV) en el compuesto de fórmula (III), preferentemente en el compuesto de fórmula (III-a), es superior a un 50 %.

- 25 En una realización, la reacción se lleva a cabo en presencia de una coenzima.

En una realización de este, R es hidrógeno o alquilo C₁-C₆, por ejemplo, etilo. En particular, R es hidrógeno.

- 30 En una realización, el dador de amina es de fórmula



donde cada uno de los grupos R' y R'', cuando se considera independientemente, es un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, que no está sustituido o que está sustituido con uno o más grupos no inhibidores enzimáticamente. R' puede ser igual o diferente de R'' en cuanto a su estructura o quiralidad. En algunas realizaciones, R' y R'', considerados conjuntamente, pueden formar un anillo.

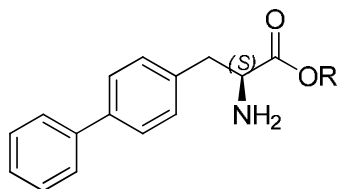
En una realización de este, el dador de amina es un dador de amina aquiral. En particular, el dador de amina aquiral se selecciona del grupo constituido por alquilamina C₁-C₇ aquiral, cicloalquilamina C₃-C₈ aquiral, (aril C₆-C₁₀)-(alquil C₁-C₇)amina aquiral, alquildiamina C₁-C₇ aquiral, ácido aminoalcanoico C₁-C₇ aquiral y (aril C₆-C₁₀)-di(alquil C₁-C₇)amina aquiral. En una realización particular, el dador de amina aquiral es isopropilamina (2-aminopropano), que como alternativa también se puede utilizar como una sal adecuada de esta.

En una realización, la coenzima utilizada es piridoxil 5'-fosfato.

En una realización, la reacción de transaminación tiene lugar en presencia de una ω -transaminasa selectiva para (R) seleccionada entre ATA-013, ATA-015, ATA-016, ATA-025, ATA-032, ATA-033, ATA-036, ATA-301, ATA-303, ATA-412, ATA-415, ATA-417 o ATA-436, comercializadas por Codexis, Inc., Redwood City, CA, EE. UU., un dador de amina, por ejemplo, isopropilamina (como alternativa, utilizada como una sal adecuada) y una coenzima, preferentemente piridoxil 5'-fosfato (PLP), en un disolvente adecuado, por ejemplo, tampón acuoso de hidrogenofosfato dipotásico, preferentemente a un pH de 7 a 10, por ejemplo, a un pH de 8 a 9, que se consigue potencialmente ajustando el valor de pH, por ejemplo, mediante la adición de isopropilamina, preferentemente a temperaturas comprendidas en el intervalo de 20 a 60 °C, por ejemplo, de 20 a 50 °C.

La tasa de conversión del compuesto de fórmula (IV) en el compuesto de fórmula (III), preferentemente en el compuesto de fórmula (III-a), es superior a un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, o incluso un 100 %.

En algunas realizaciones, la transaminasa es capaz de convertir el compuesto sustrato de fórmula (IV), en particular el compuesto ácido 3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oxopropanoico, en el compuesto producto de fórmula (III) y (III-a), respectivamente, en particular el compuesto ácido (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoico, con un exceso enantiomérico superior a un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior respecto al compuesto correspondiente de fórmula (III-b)



(III-b)

donde R se selecciona entre hidrógeno y un grupo protector de carboxilo, por ejemplo, alquilo C₁-C₆, preferentemente hidrógeno, en condiciones de reacción adecuadas.

En una realización, la reacción de la transaminasa tiene lugar en presencia de una ω -transaminasa selectiva para (R) seleccionada entre ATA-013, ATA-015, ATA-016, ATA-025, ATA-032, ATA-033, ATA-036, ATA-301, ATA-303, ATA-412, ATA-415, ATA-417 o ATA-436 y consigue una tasa de conversión del compuesto de fórmula (IV) en el compuesto de fórmula (III), preferentemente en el compuesto de fórmula (III-a), superior a un 90 % y produce el compuesto producto de fórmula (III-a), en particular el compuesto ácido (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoico, con un exceso enantiomérico superior a un 85 % o superior respecto al compuesto correspondiente de fórmula (III-b).

En algunas realizaciones, las transaminasas utilizadas en la presente divulgación son capaces de convertir el compuesto (IV) en el compuesto (III-a) con una mayor tolerancia a la presencia de sustrato en condiciones de reacción adecuadas. Por tanto, en algunas realizaciones, las transaminasas son capaces de convertir el compuesto sustrato (IV) en el compuesto producto (III-a), respectivamente, en presencia de una concentración de carga de sustrato de al menos aproximadamente 1 g/L, aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 10 g/L, aproximadamente 20 g/L, aproximadamente 30 g/L, aproximadamente 40 g/L, aproximadamente 50 g/L, aproximadamente 70 g/L, aproximadamente 80 g/L o superior. Tal carga de sustrato sigue consiguiendo un porcentaje de conversión de al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % o un 100%, en un tiempo de reacción de aproximadamente 120 h o menos, aproximadamente 96 h o menos, aproximadamente 72 h o menos, aproximadamente 48 h o menos, aproximadamente 36 h o menos, o aproximadamente 24 h o menos, aproximadamente 18 h o menos o incluso 12 h o menos, en condiciones de reacción adecuadas.

Las condiciones de reacción adecuadas para conseguir tales tasas de conversión se pueden determinar con respecto a las concentraciones o cantidades de transaminasa, sustrato, cofactor, tampón, codisolvente, pH y/o condiciones que incluyen la temperatura y el tiempo de reacción, tal como se describe adicionalmente más adelante y en los Ejemplos.

Métodos detallados de uso de enzimas transaminasas

Para los procesos anteriores, se utilizaron preferentemente las ω -transaminasas que se pueden obtener de Codexis Inc. con los números de referencia ATA-013, ATA-015, ATA-016, ATA-25, ATA-032, ATA-033, ATA-036, ATA-301, ATA-303, ATA-412, ATA-415, ATA-417 y ATA-436 (ya sea como parte del kit de cribado Codex® ATA o como variantes adicionales de ω -transaminasas modificadas genéticamente, también obtenidas de Codexis Inc.). Tales ω -transaminasas modificadas genéticamente se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 9 889 380, 8 293 507 y 9 133 445, la patente EP N.º EP2401366 y la solicitud de PCT WO 2010/099501.

En las realizaciones de la presente e ilustrados en los Ejemplos, se encuentran varios intervalos de condiciones de reacción adecuadas que se pueden utilizar en los procesos, que incluyen, sin carácter limitante, intervalos de dadores de amino, pH, temperatura, tampón, sistema de disolventes, carga de sustrato, carga de enzima (transaminasa), carga de cofactor, presión y tiempo de reacción. Otras condiciones de reacción adecuadas para llevar a cabo el proceso de la transaminasa reivindicado se pueden optimizar fácilmente teniendo en cuenta las directrices proporcionadas en la presente mediante experimentación rutinaria que incluye, sin carácter limitante, poner en contacto la transaminasa y el compuesto sustrato en condiciones de reacción experimentales de concentración, pH, temperatura, condiciones de disolvente y detectar el compuesto producto.

En una realización de la invención, la transaminasa utiliza isopropilamina (a la que también se hace referencia en la presente como «IPM») como dador de amina. Las condiciones de reacción adecuadas comprenden que el dador de amina, en particular IPM, esté presente con una concentración de al menos aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0 M, de 0,2 a aproximadamente 2,5 M, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 M o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 M. En algunas realizaciones, el dador de amino está presente con una concentración de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 M. Se pueden utilizar concentraciones más elevadas del dador de amina, por ejemplo, IPM, para desplazar el equilibrio hacia la formación del producto de tipo amina.

Las condiciones de reacción adecuadas también comprenden habitualmente un cofactor. En una realización, los cofactores son piridoxal-5'-fosfato. En algunas realizaciones, el cofactor PLP está presente de forma natural en el extracto celular y no es necesario que se proporcione como un suplemento. En otras realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden que el cofactor se añada a la mezcla de reacción enzimática, por ejemplo, cuando se utiliza una enzima transaminasa purificada o parcialmente purificada. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender la presencia de un cofactor, preferentemente PLP, con una concentración de aproximadamente 0,1 g/L a aproximadamente 10 g/L, de aproximadamente 0,2 g/L a aproximadamente 5 g/L, de aproximadamente 0,5 g/L a aproximadamente 2,5 g/L. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden una concentración de PLP de aproximadamente 0,1 g/L o inferior, 0,2 g/L o inferior, 0,5 g/L o inferior, 1 g/L o inferior, 2,5 g/L o inferior, 5 g/L o inferior, o 10 g/L o inferior. En algunas realizaciones, el cofactor se puede añadir o bien al comienzo de la reacción y/o se puede añadir cofactor adicional durante la reacción.

La concentración del compuesto sustrato de fórmula (IV) en la mezcla de reacción puede variar, teniendo en cuenta, por ejemplo, la cantidad deseada de compuesto producto, el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática, la estabilidad de la enzima en las condiciones de reacción y el porcentaje de conversión de sustrato en producto. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una carga de compuesto sustrato de al menos aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 g/L, de 1 a aproximadamente 90 g/L, de 5 a aproximadamente 80 g/L, de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 g/L, de 20 a aproximadamente 60 g/L o de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 g/L. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una carga de compuesto de sustrato de al menos aproximadamente 0,5 g/L, al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 5 g/L, al menos aproximadamente 10 g/L, al menos aproximadamente 15 g/L, al menos aproximadamente 20 g/L, al menos aproximadamente 30 g/L, al menos aproximadamente 50 g/L, al menos aproximadamente 75 g/L o al menos aproximadamente 80 g/L.

Las condiciones de reacción adecuadas comprenden una concentración de transaminasa de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 g/L; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 50 g/L; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 g/L; de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 g/L; de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 g/L; de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 g/L; de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 g/L; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 g/L; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 g/L; de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 g/L; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 g/L; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 g/L; o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 g/L. En algunas realizaciones, la concentración de transaminasa es de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 g/L.

Durante el transcurso de las reacciones de transaminación, el pH de la mezcla de reacción puede cambiar. El pH de la mezcla de reacción se puede mantener en un pH deseado o dentro de un intervalo de pH deseado. Esto se puede hacer mediante la adición de un ácido o una base, antes y/o durante el transcurso de la reacción. Como alternativa, el pH se puede controlar utilizando un tampón. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden un pH de la solución que comprende un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 12, un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11, un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10, un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 o un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden un pH de la solución de aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10,0 10,5, 11, 11,5 o 12.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden un tampón. Los tampones adecuados para mantener los intervalos de pH deseados son conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, tampones de borato, carbonato, fosfato, trietanolamina y similares. En algunas realizaciones, el tampón es borato. En algunas realizaciones del proceso, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una solución tampón de fosfato, donde la concentración de fosfato es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,4 M, de 0,01 a aproximadamente 0,2 M, de 0,05 a aproximadamente 0,1 M o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 M. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden una concentración de fosfato de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,07, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18, 0,2, 0,3 o 0,4 M. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden agua como disolvente adecuado pero no hay ningún tampón presente.

En las realizaciones del proceso de transaminación, se puede utilizar una temperatura adecuada para las condiciones de reacción, por ejemplo, teniendo en cuenta el aumento de la velocidad de reacción a temperaturas más elevadas y la actividad de la enzima durante el período de tiempo de la reacción. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 65 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 55 °C o de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una temperatura de aproximadamente 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C o 70 °C. En algunas realizaciones, la temperatura durante la reacción enzimática se puede mantener a una temperatura a lo largo del transcurso de la reacción. En algunas realizaciones, la temperatura durante la reacción enzimática se puede ajustar en un perfil de temperatura durante el transcurso de la reacción.

Los procesos de la divulgación se llevan a cabo generalmente en un disolvente. Los disolventes adecuados incluyen agua, soluciones tampón acuosas, disolventes orgánicos, disolventes poliméricos y/o sistemas de codisolventes, que generalmente comprenden disolventes acuosos, disolventes orgánicos y/o disolventes poliméricos. El disolvente acuoso (agua o sistema de codisolventes acuoso) puede tener el pH tamponado o sin tamponar. En algunas realizaciones, los procedimientos de transaminasas se llevan a cabo generalmente en un sistema de codisolventes acuoso que comprende un disolvente orgánico (por ejemplo, etanol, isopropanol (IPA), sulfóxido de dimetilo (DMSO), acetato de etilo, acetato de butilo, 1-octanol, heptano, octano, éter *tert*-butil metílico (MTBE), tolueno y similares), disolventes iónicos o polares (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-etil-4-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, glicerol, polietilenglicol y similares). En algunas realizaciones, el codisolvente puede ser un disolvente polar, tal como un poliol, sulfóxido de dimetilo, DMSO, o un alcohol inferior. El componente codisolvente no acuoso de un sistema de codisolventes acuoso puede ser miscible con el componente acuoso, de manera que proporciona una única fase líquida, o puede ser parcialmente miscible o inmiscible con el componente acuoso, de manera que proporciona dos fases líquidas. Los ejemplos de sistemas de codisolventes acuosos pueden comprender agua y uno o más codisolventes seleccionados entre un disolvente orgánico, un disolvente polar y un disolvente de tipo poliol. En general, el componente codisolvente de un sistema de codisolventes acuoso se selecciona de modo que no desactive de manera adversa a la enzima transaminasa en las condiciones de reacción. Los sistemas de codisolventes adecuados se pueden identificar fácilmente midiendo la actividad enzimática de la enzima transaminasa especificada con un sustrato definido de interés en el sistema de disolventes candidato, utilizando un ensayo de actividad enzimática, tal como los descritos en la presente.

En algunas realizaciones del proceso, las condiciones de reacción adecuadas comprenden un cosolvente acuoso, donde el cosolvente comprende un disolvente de tipo poliol, particularmente glicoles. Los ejemplos de disolventes de tipo poliol adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, polietilenglicol, éter metílico del polietilenglicol, éter dimetílico del dietilenglicol, éter dimetílico del trietilenglicol y propilenglicol. En algunas realizaciones, el codisolvente acuoso comprende polietilenglicol, que está disponible con diferentes pesos moleculares. Son particularmente útiles los glicoles de peso molecular más bajo tales como de PEG200 a PEG600. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el codisolvente acuoso comprende PEG200, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 40 % v/v; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 40 % v/v; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 40 % v/v; de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % v/v; de un 2 % a aproximadamente un 30 % v/v; de un 5 % a aproximadamente un 30 % v/v; de un 1 a aproximadamente un 20 % v/v; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 20 % v/v; de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % v/v; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % v/v; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % v/v. En algunas

realizaciones, las condiciones de reacción adecuadas comprenden un codisolvente acuoso que comprende PEG200 con una concentración de aproximadamente un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 35 % o aproximadamente un 40 % v/v. Preferentemente, no se utiliza ningún codisolvente.

- 5 En algunas realizaciones del proceso, las condiciones de reacción adecuadas comprenden un codisolvente acuoso, donde el codisolvente comprende DMSO con una concentración de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 80 % (v/v), de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 70 % (v/v), de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 60 % (v/v), de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % (v/v), de un 10 % a aproximadamente un 40 % (v/v), de un 10 % a aproximadamente un 30 % (v/v) o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % (v/v). En algunas
- 10 realizaciones del proceso, las condiciones de reacción adecuadas comprenden un codisolvente acuoso que comprende DMSO con una concentración de al menos aproximadamente un 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % (v/v).

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción también puede contener surfactantes.

- 15 Las cantidades de reactivos utilizadas en la reacción de transaminación variarán generalmente dependiendo de las cantidades de producto deseadas, y concomitantemente la cantidad de sustrato de la transaminasa empleada. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente cómo variar estas cantidades para adaptarlas al nivel deseado de productividad y escala de producción.

20 En algunas realizaciones, el orden de adición de los reactivos no es crítico. Los reactivos se pueden añadir juntos al mismo tiempo a un disolvente (por ejemplo, disolvente monofásico, sistema de codisolventes acuoso bifásico, y similares) o, como alternativa, algunos de los reactivos se pueden añadir por separado y algunos juntos, en diferentes momentos. Por ejemplo, el cofactor, la transaminasa y el sustrato de la transaminasa se pueden añadir al disolvente en primer lugar.

- 25 Los reactivos sólidos (por ejemplo, enzima, sales, etc.) se pueden proporcionar a la reacción de diversas formas, que incluyen en polvo (por ejemplo, liofilizado, secado por pulverización y similares), solución, emulsión, suspensión y similares. Los reactivos se pueden liofilizar o secar por pulverización fácilmente, empleando métodos y equipos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la solución de proteína se puede congelar a -80 °C en alícuotas pequeñas, a continuación se añade a la cámara de liofilización previamente enfriada y seguidamente se le aplica el vacío.
- 30

Para conseguir una mayor eficacia de la mezcla cuando se utiliza un sistema de codisolventes acuoso, la transaminasa y el cofactor se pueden añadir y mezclar en primer lugar en la fase acuosa. A continuación, se puede añadir la fase orgánica y mezclarla, lo cual va seguido de la adición del sustrato de la transaminasa. Como alternativa, el sustrato de la transaminasa se puede mezclar previamente en la fase orgánica, antes de la adición a la fase acuosa.

- 35 Por lo general, se deja que la reacción de transaminación proceda hasta que la conversión adicional del sustrato de tipo cetona en el producto de tipo amina no cambie significativamente con el tiempo de reacción, por ejemplo, se convierte menos de un 10 % de sustrato o se convierte menos de un 5 % de sustrato. En algunas realizaciones, se deja que la reacción proceda hasta que se obtenga una conversión completa o casi completa de la cetona que actúa como sustrato en la amina que actúa como producto. La transformación de sustrato en producto se puede monitorizar empleando métodos conocidos para detectar el sustrato y/o producto. Los métodos adecuados incluyen cromatografía de gases, HPLC y similares. Los rendimientos de la conversión del producto de tipo amina quiral que se genera en la mezcla de reacción son generalmente superiores a aproximadamente un 50 %, también pueden ser superiores a aproximadamente un 60 %, también pueden ser superiores a aproximadamente un 70 %, también pueden ser superiores a aproximadamente un 80 %, también pueden ser superiores a un 90 % y suelen ser superiores a aproximadamente un 97 %.
- 40
- 45

En general, la reacción de transaminación proseguirá durante un tiempo de reacción de aproximadamente 120 h o menos, aproximadamente 96 h o menos, aproximadamente 72 h o menos, aproximadamente 48 h o menos, aproximadamente 36 h o menos, aproximadamente 24 h o menos, aproximadamente 18 h o menos, o aproximadamente 12 h o menos, en condiciones de reacción adecuadas.

- 50 En algunas realizaciones, los métodos para preparar compuestos de fórmula (III) y (III-a) utilizando una transaminasa en condiciones de reacción adecuadas dan como resultado una conversión de al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior del sustrato de tipo cetona, por ejemplo, compuesto de fórmula (IV), respectivamente, en el compuesto producto de tipo amina, por ejemplo, compuesto de fórmula (III) y (III-a), respectivamente, en aproximadamente 48 h o menos, en aproximadamente 36 h o menos, en aproximadamente 24 h o menos, en aproximadamente 18 h o menos, o incluso menos tiempo.
- 55

60 En una realización adicional, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una carga inicial de sustrato en la solución de reacción que después se pone en contacto con la transaminasa. Esta solución de reacción se suplementa a continuación adicionalmente con compuesto sustrato adicional como una adición continua en el tiempo a una velocidad de al menos aproximadamente 1 g/L/h, al menos aproximadamente 2 g/L/h, al menos aproximadamente 4 g/L/h, al menos aproximadamente 6 g/L/h o superior. Por tanto, de acuerdo con estas condiciones de reacción adecuadas, la transaminasa se añade a una solución que tiene una carga inicial de sustrato de al menos aproximadamente 20 g/L, 30 g/L o 40 g/L.

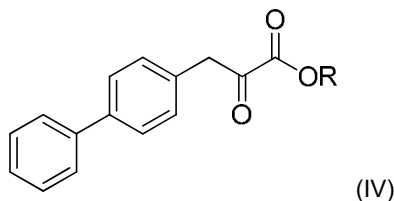
65

- Esta adición de transaminasa va seguida a continuación por la adición continua de sustrato adicional a la solución con una velocidad de aproximadamente 2 g/L/h, 4 g/L/h o 6 g/L/h hasta que se alcanza una carga final de sustrato mucho mayor de al menos aproximadamente 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L o superior. Por consiguiente, en algunas realizaciones del método, las condiciones de reacción adecuadas comprenden la adición de la transaminasa a una solución que tiene una carga inicial de sustrato de al menos aproximadamente 20 g/L, 30 g/L o 40 g/L seguida de la adición de sustrato adicional a la solución con una velocidad de aproximadamente 2 g/L/h, 4 g/L/h o 6 g/L/h hasta que se alcanza una carga final de sustrato de al menos aproximadamente 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 100 g/L o superior. Estas condiciones de reacción de suplementación del sustrato permiten lograr cargas de sustrato más elevadas a la vez que se mantienen unas tasas elevadas de conversión del sustrato de tipo cetona en el producto de tipo amina de al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superiores. En algunas realizaciones de este método, el sustrato adicional añadido está en una solución que comprende isopropilamina o acetato de isopropilamina con una concentración de al menos aproximadamente 0,5 M, al menos aproximadamente 1,0 M, al menos aproximadamente 2,5 M, al menos aproximadamente 5,0 M, al menos aproximadamente 7,5 M, al menos aproximadamente 10,0 M.
- En algunas realizaciones de los procesos, la reacción de transaminación puede comprender las siguientes condiciones de reacción adecuadas: (a) carga de sustrato de aproximadamente 5 g/L a 100 g/L; (b) de aproximadamente 0,1 a 50 g/L de transaminasa; (c) de aproximadamente 0,1 a 4 M de isopropilamina (IPM); (d) de aproximadamente 0,1 a 10 g/L de cofactor piridoxal-fosfato (PLP); (e) pH de aproximadamente 6 a 10; y (f) temperatura de aproximadamente 30 a 60 °C.
- En algunas realizaciones de los procesos, la reacción de transaminación puede comprender las siguientes condiciones de reacción adecuadas: (a) carga de sustrato de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 g/L; (b) de aproximadamente 0,5 a 25 g/L de transaminasa; (c) de aproximadamente 0,1 a 2 M de isopropilamina (IPM); (d) de aproximadamente 0,1 a 1 g/L de cofactor piridoxal-fosfato (PLP); (e) pH de aproximadamente 8 a 10; (f) temperatura de aproximadamente 40 a 55 °C; y (g) tiempos de reacción de 18 h a 36 h.
- En algunas realizaciones de los procesos, la reacción de transaminación puede comprender las siguientes condiciones de reacción adecuadas: (a) carga de sustrato de aproximadamente 25 a aproximadamente 80 g/L; (b) de aproximadamente 0,5 a 10 g/L de transaminasa; (c) de aproximadamente 0,1 a 2 M de isopropilamina (IPM); (d) de aproximadamente 0,1 a 1 g/L de cofactor piridoxal-fosfato (PLP); (e) de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,1 M de tampón de borato (o comparable); (f) pH de aproximadamente 8 a 10; (g) temperatura de aproximadamente 40 a 55 °C.
- En algunas realizaciones, se utilizan componentes de reacción adicionales o se llevan a cabo técnicas adicionales para complementar las condiciones de reacción. Estos pueden incluir tomar medidas para estabilizar o prevenir la desactivación de la enzima, reducir la inhibición del producto, desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto.
- Por consiguiente, en algunas realizaciones del proceso para preparar una amina, tal como una amina quiral, se pueden añadir cantidades adicionales del aceptor de amino (hasta la saturación) y/o el aceptor de amino (cetona) formado se puede extraer continuamente de la mezcla de reacción. Por ejemplo, se puede utilizar un puente de disolventes o un sistema de codisolventes de dos fases para transportar el producto de tipo amina a una solución de extracción y reducir de esa manera la inhibición por parte del producto de tipo amina y también desplazar el equilibrio hacia la formación del producto (remítase, por ejemplo, a Yun y Kim, 2008, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, 72, 3030-3033).
- En algunas realizaciones, en las que la elección del dador de amino da como resultado un subproducto de tipo carbonilo que tiene una presión de vapor superior a la del agua (por ejemplo, un coproducto con un punto de ebullición bajo tal como un compuesto de tipo carbonilo orgánico volátil), el subproducto de tipo carbonilo se puede eliminar haciendo burbujear un gas no reactivo a través de la solución de reacción o aplicando vacío para disminuir la presión de la reacción y eliminando el subproducto de tipo carbonilo presente en la fase gaseosa. Un gas no reactivo es cualquier gas que no reacciona con los componentes de la reacción. Diversos gases no reactivos incluyen nitrógeno y gases nobles (por ejemplo, gases inertes). En algunas realizaciones, el gas no reactivo es nitrógeno gaseoso. En algunas realizaciones, el dador de amino utilizado en el proceso es isopropilamina (IPM), que forma el subproducto de tipo carbonilo acetona, después de la transferencia del grupo amino al grupo aceptor de amino. La acetona se puede eliminar haciendo burbujear nitrógeno gaseoso o aplicando vacío a la solución de reacción y eliminando la acetona de la fase gaseosa mediante una trampa de acetona tal como un condensador u otra trampa fría.
- En algunas realizaciones de los procesos anteriores en las que se elimina el subproducto de tipo carbonilo, el dador del grupo amino correspondiente se puede añadir durante la reacción de transaminación para reponer el grupo dador de amino y/o mantener el pH de la reacción. El hecho de reponer el dador del grupo amino también desplaza el equilibrio hacia la formación del producto, con lo que se aumenta de este modo la conversión de sustrato en producto. Por lo tanto, en algunas realizaciones en las que el dador del grupo amino es isopropilamina y el producto de acetona se elimina *in situ*, se puede añadir isopropilamina a la solución para reponer el dador del grupo amino que se pierde durante la eliminación de acetona.

En otras realizaciones, cualquiera de los procesos descritos anteriormente para la conversión del compuesto sustrato en el compuesto producto puede comprender además uno o más pasos seleccionados entre: extracción, aislamiento, purificación y cristalización del compuesto producto. Los métodos, las técnicas y los protocolos para extraer, aislar, purificar y/o cristalizar el producto de tipo amina a partir de mezclas de reacción biocatalíticas producidas mediante los métodos divulgados anteriormente, son conocidos por el experto y/o accesibles mediante experimentación rutinaria.

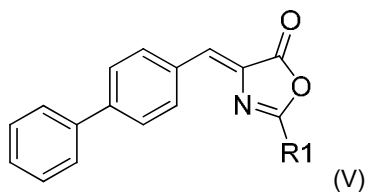
Reacciones de acuerdo con el ESQUEMA 1 y el ESQUEMA 1-a - pasos a y b

En el primer aspecto de la presente invención, el paso obligatorio del proceso c del ESQUEMA 1 y del ESQUEMA 1-a, respectivamente, va precedido por los pasos de reacción b y a. Por consiguiente, en una realización adicional, el material de partida de la reacción de la transaminasa, a saber, el compuesto de fórmula (IV), o una sal de este,



donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

se obtiene mediante un proceso que comprende la hidrólisis de un compuesto de fórmula (V),

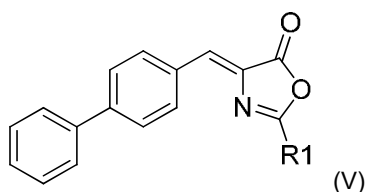


donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido, en condiciones ácidas o básicas, para obtener un compuesto de fórmula (IV) donde R es hidrógeno, y opcionalmente la introducción de un grupo protector de carboxilo R. Dicho paso del proceso va seguido a continuación por la reacción de la transaminasa mencionada anteriormente para proporcionar el compuesto de fórmula (III) y (III-a), respectivamente.

En una realización de este, R1 es metilo, bencilo o fenilo.

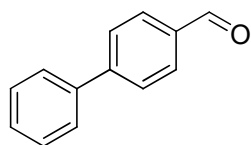
Las condiciones de reacción adecuadas son muy conocidas en la técnica. La reacción tiene lugar preferentemente en presencia de un ácido inorgánico acuoso, por ejemplo, un ácido halhídrico tal como ácido clorhídrico, o ácido sulfúrico, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado, por ejemplo, un ácido carboxílico tal como ácido acético y/o agua, a temperaturas preferidas comprendidas en el intervalo desde 50 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 70 a 100 °C; o una base inorgánica acuosa, por ejemplo, un hidróxido alcalino tal como hidróxido de sodio, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado, por ejemplo, agua, a temperaturas preferidas comprendidas en el intervalo desde 50 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 70 a 100 °C.

En una realización adicional de la presente invención,



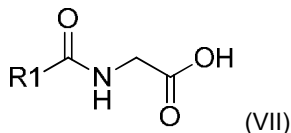
donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido,

se puede obtener mediante un proceso que comprende una reacción del compuesto de fórmula (VI)



(VI)

con un compuesto de fórmula (VII) o una sal de este



(VII)

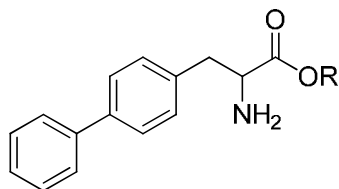
donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido.

Las condiciones de reacción adecuadas son muy conocidas en la técnica (por ejemplo, síntesis de azlactonas de Erlenmeyer). La reacción tiene lugar preferentemente en presencia de un agente activante tal como anhídrido acético, opcionalmente en un disolvente adecuado, por ejemplo, tolueno o un éter tal como tetrahidrofurano, y una base inorgánica, por ejemplo, un acetato alcalino tal como acetato de sodio, a temperaturas preferidas comprendidas en el intervalo desde 50 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 70 a 100 °C.

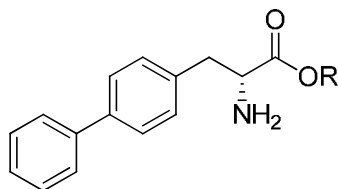
Se describen métodos alternativos para la preparación del compuesto de fórmula (IV) en US4721726, US4447644, *Tetrahedron* **2012**, 68, 3708-3716, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1864-1871 o WO 2011/035569 (paso a).

Reacciones de acuerdo con el ESQUEMA 2 y ESQUEMA 2-a, ESQUEMA 2* y ESQUEMA 2*-a, y ESQUEMA 2** y ESQUEMA 2**-a:

En el **primer aspecto** de la presente invención, el compuesto de fórmula (III) y (III-a), respectivamente,

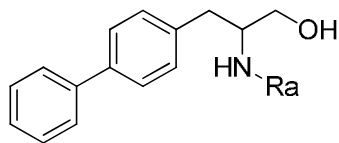


(III) y



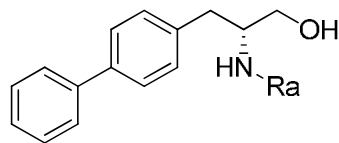
(III-a)

donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, obtenido como resultado de la reacción de la transaminasa, se convierte a continuación en un paso posterior en un compuesto de fórmula (I) y (I-a), respectivamente, o sales de estos



(I)

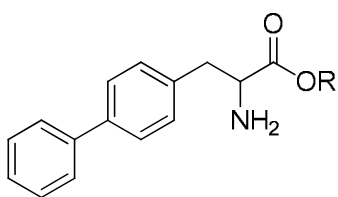
y



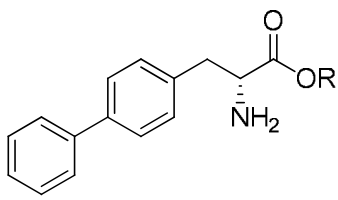
(I-a)

donde Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante una secuencia de reacciones tal como se representa en cualquiera de entre el ESQUEMA 2 y ESQUEMA 2-a, ESQUEMA 2* y ESQUEMA 2*-a, y ESQUEMA 2** y ESQUEMA 2**-a, respectivamente.

En una **primera** realización de este, de acuerdo con el ESQUEMA 2 y el ESQUEMA 2-a, paso d, el compuesto obtenido de fórmula (III), o una sal de este

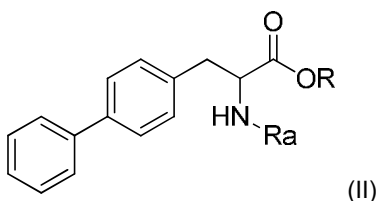


preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este

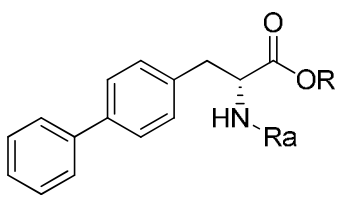


donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

se convierte en un compuesto de fórmula (II), o una sal de este



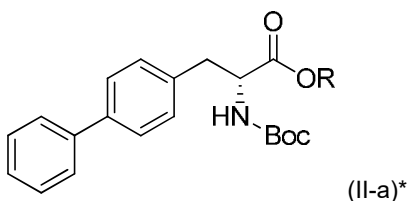
preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este



donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, y Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la introducción de un grupo protector de nitrógeno Ra.

En una realización de este, R es hidrógeno.

En una realización, el compuesto de fórmula (II-a) es de fórmula (II-a)*

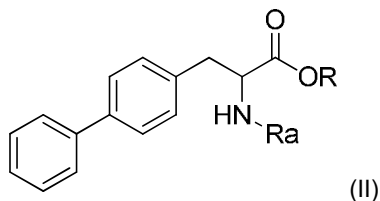


donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, preferentemente hidrógeno, que se obtiene mediante la reacción del compuesto de fórmula (III-a) con dicarbonato de di-*tert*-butilo.

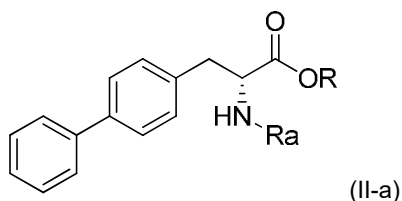
En una realización de este, la reacción puede tener lugar en las condiciones habituales y utilizando un reactivo conocido en la técnica que introduce un grupo protector de amino tal como un anhídrido, por ejemplo, para la introducción del grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) preferido, preferentemente la reacción utiliza dicarbonato de di-*tert*-butilo (anhídrido de Boc) como reactivo y se lleva a cabo en presencia de una base tal como una base inorgánica, por ejemplo, un hidróxido alcalino tal como hidróxido de sodio, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado, por ejemplo, en una mezcla de

un disolvente orgánico tal como tetrahidrofurano y agua, por ejemplo, a temperatura ambiente tal como de 20 °C a 40 °C; o una base orgánica, por ejemplo, trietilamina, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado tal como un alcohol, por ejemplo, metanol, un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano o 1,4- dioxano, o diclorometano a temperaturas comprendidas, por ejemplo, en el intervalo desde -20 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 0 a 30 °C.

En una realización adicional de este, de acuerdo con el ESQUEMA 2 y el ESQUEMA 2-a, paso e, el compuesto de fórmula (II) que se acaba de obtener, o una sal de este

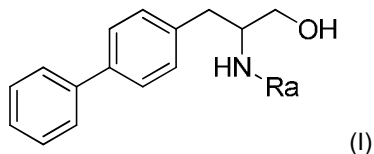


preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este

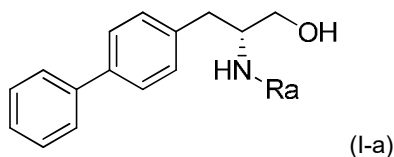


donde en ambas fórmulas, R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo y Ra es un grupo protector de nitrógeno.

se convierte en un compuesto de fórmula (I), o una sal de este



preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este



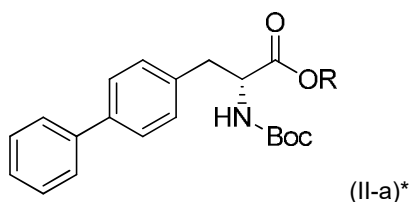
donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la reducción del compuesto de fórmula (II) en presencia de un agente reductor.

En una realización, cuando en el compuesto de fórmula (II) y (II-a), respectivamente, R es hidrógeno, es decir, la reacción es una reducción del grupo carboxílico libre, se utiliza un agente activante tal como un cloruro de acilo, por ejemplo, cloruro de pivaloilo, o un cloroformiato, por ejemplo, cloroformiato de isobutilo, en presencia de una base orgánica, por ejemplo, una base de tipo amina tal como *N*-metilmorfolina, a continuación se utilizan hidruros complejos tales como un borohidruro de un metal alcalino, por ejemplo, borohidruro de sodio, o un hidruro de aluminio y un metal alcalino tal como hidruro de aluminio y litio. La reacción tiene lugar preferentemente en un disolvente o mezcla de disolventes habitual, por ejemplo, un éter tal como tetrahidrofurano, o una mezcla de un éter tal como tetrahidrofurano y agua, a temperaturas adecuadas, por ejemplo, en el intervalo de -40 a 40 °C, por ejemplo, de -20 a 25 °C. Como alternativa, se puede utilizar hidruro de diisobutilaluminio, borano, Red-Al (hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio y sodio) o tetrahidrobórato de sodio en combinación con yodo en un solvente adecuado tal como un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano, a temperaturas bajas, por ejemplo, en el intervalo de -100 a 0 °C, por ejemplo, a -78 °C.

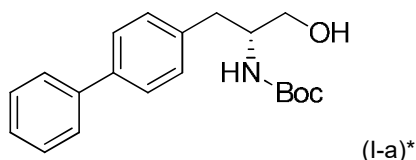
En una realización alternativa, cuando en el compuesto de fórmula (II) y (II-a), respectivamente, R es un grupo protector de carboxilo, es decir, la reacción es una reducción del grupo carboxílico esterificado, se utilizan hidruros complejos tales como un borohidruro de un metal alcalino, por ejemplo, borohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio,

o un hidruro de aluminio y un metal alcalino tal como hidruro de aluminio y litio, o borano o complejos de borano, o hidruros de alquilaluminio tales como DIBAL. La reacción tiene lugar preferentemente en un disolvente o mezcla de disolventes habitual, por ejemplo, un éter tal como tetrahidrofurano, o una mezcla de un éter tal como tetrahidrofurano y un alcohol tal como metanol, opcionalmente en presencia de un aditivo, por ejemplo, un haluro alcalino tal como cloruro de litio, a temperaturas adecuadas, por ejemplo, en el intervalo de -20 a 40 °C, por ejemplo, de 0 a 25 °C. En los casos en que R es un grupo alquilo o arilo, la reducción también se puede conseguir mediante hidrogenación en presencia de catalizadores metálicos adecuados tales como Pd/C.

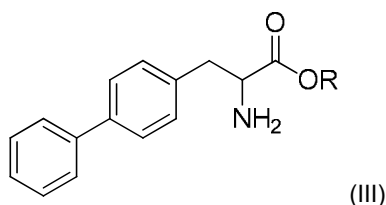
En una realización preferida, el compuesto de fórmula (II-a)*



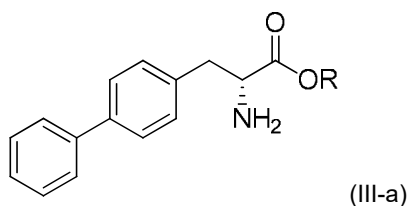
donde R es hidrógeno, se activa mediante una reacción con cloroformiato de isobutilo en presencia de *N*-metilmorfolina, seguida de una reducción utilizando borohidruro de sodio para obtener el compuesto de fórmula (I-a)*



En una **segunda** realización de este, de acuerdo con el ESQUEMA 2* y el ESQUEMA 2*-a, paso d, el compuesto obtenido de fórmula (III), o una sal de este

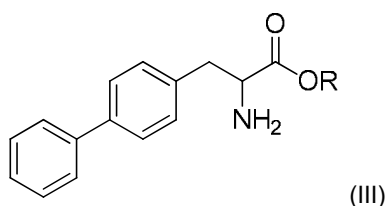


preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este

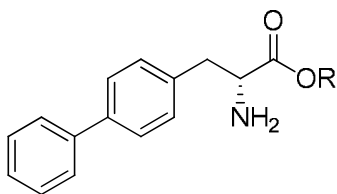


donde en ambas fórmulas R es hidrógeno,

se convierte en primer lugar en un compuesto de fórmula (III), o una sal de este



preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este

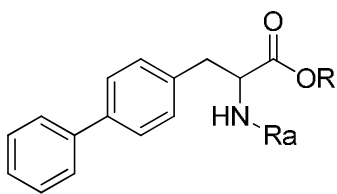


(III-a)

donde en ambas fórmulas R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇),

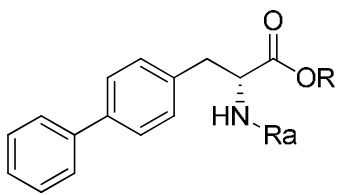
- 5 mediante un proceso que comprende la reacción con un alcohol R-OH donde R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido (reacción de esterificación),

el cual a continuación se convierte posteriormente en un compuesto de fórmula (II), o una sal de este



(II)

preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este



(II-a)

15 donde en ambas fórmulas R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇), y Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la introducción de un grupo protector de nitrógeno Ra.

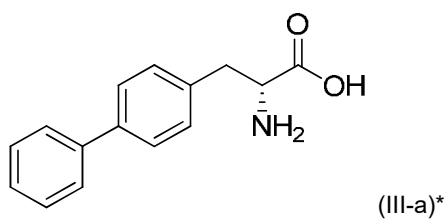
En una realización, la reacción de esterificación utiliza metanol y, por consiguiente, R es metilo.

20 En otra realización, el grupo protector de nitrógeno es *tert*-butoxicarbonilo (Boc) y, por lo tanto, el segundo paso de reacción utiliza dicarbonato de di-*tert*-butilo.

25 En una realización, la reacción de esterificación puede tener lugar en condiciones habituales utilizando el alcohol R-OH deseado donde R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido, preferentemente alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) no sustituido, preferentemente alquilo C₁-C₇ tal como metilo, etilo, fenetilo o bencilo, más preferentemente metilo, en presencia de un agente activante, por ejemplo, un agente para transformar el ácido carboxílico libre en un haluro de acilo o anhídrido de ácido, antes de realizar la reacción de esterificación en sí. Los reactivos adecuados para la formación de un haluro de acilo se seleccionan, por ejemplo, entre cloruro de tionilo, bromuro de tionilo, PCl₃, PCl₅, cloruro de oxalilo, Me₂C=C(Cl)NMe₂, PhCOCl, PBr₃, PBr₅, Ph₃PBr₂, bromuro de oxalilo o Me₂C=C(Br)NMe₂. La reacción tiene lugar preferentemente en un disolvente habitual tal como el alcohol R-OH respectivo tal como se ha definido anteriormente, preferentemente metanol o etanol, y a temperaturas adecuadas, por ejemplo, en el intervalo de 0 a 100 °C, por ejemplo, de 10 a 90 °C.

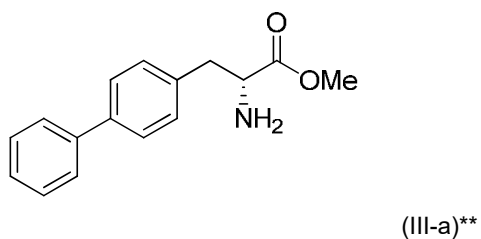
35 En otra realización, el segundo paso, a saber, la introducción del grupo protector de nitrógeno en el compuesto de fórmula (III) y (III-a), respectivamente, donde R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇), se puede llevar a cabo tal como se ha descrito anteriormente: la reacción puede tener lugar en las condiciones habituales y utilizando un reactivo conocido en la técnica que introduce un grupo protector de amino tal como un anhídrido, por ejemplo, para la introducción del grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) preferido, preferentemente la reacción utiliza dicarbonato de di-*tert*-butilo (anhídrido de Boc) como reactivo y se lleva a cabo en presencia de una base tal como una base inorgánica, por ejemplo, un hidróxido alcalino tal como hidróxido de sodio, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado, por ejemplo, en una mezcla de un disolvente orgánico tal como tetrahidrofurano, o tetrahidrofurano y agua, por ejemplo, a temperatura ambiente tal como de 20 °C a 40 °C; o con una base orgánica, por ejemplo, trietilamina, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado tal como tolueno, un alcohol, por ejemplo, metanol, un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano o 1,4- dioxano, o diclorometano a temperaturas comprendidas, por ejemplo, en el intervalo desde -20 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 0 a 30 °C.

En una realización preferida de este, el compuesto obtenido es de fórmula (III-a)*, o una sal de este



5

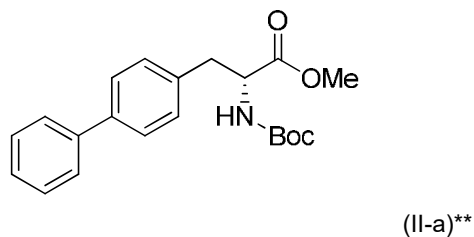
el cual se convierte en primer lugar en un compuesto de fórmula (III-a)** , o una sal de este



10

mediante un proceso que comprende una reacción con metanol,

y a continuación se convierte posteriormente en un compuesto de fórmula (II-a)** , o una sal de este

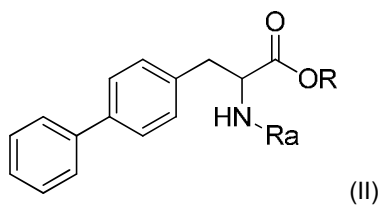


15

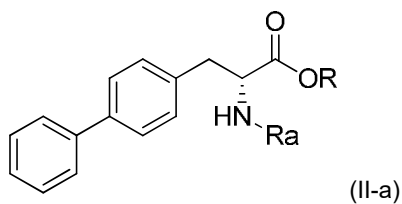
mediante la reacción del compuesto de fórmula (III-a)** con dicarbonato de di-*tert*-butilo.

En una realización adicional de este, de acuerdo con el ESQUEMA 2* y el ESQUEMA 2*-a, paso e, el compuesto de fórmula (II) que se acaba de obtener, o una sal de este

20



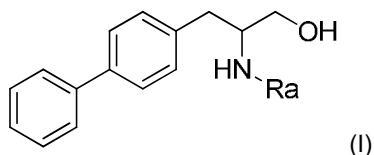
preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este



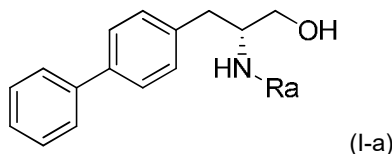
25

donde en ambas fórmulas R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido, preferentemente alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) no sustituido, y Ra es un grupo protector de nitrógeno,

5 se convierte en un compuesto de fórmula (I), o una sal de este



10 preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este

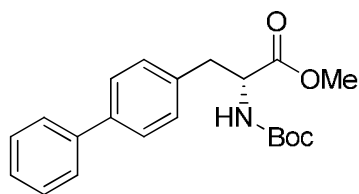


donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno,

15 mediante un proceso que comprende la reducción del compuesto de fórmula (II) y (II-a), respectivamente, en presencia de un agente reductor.

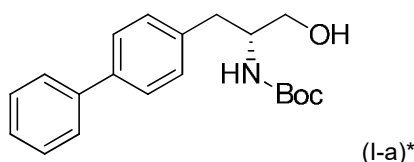
En una realización de este, la reducción del grupo carboxílico esterificado se lleva a cabo con el uso de hidruros complejos, tales como un borohidruro de un metal alcalino, por ejemplo, borohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, o un hidruro de aluminio y un metal alcalino tal como hidruro de aluminio y litio, o borano o complejos de borano, o hidruros de alquilaluminio tales como DIBAL. La reacción tiene lugar preferentemente en un disolvente o mezcla de disolventes habitual, por ejemplo, un éter tal como tetrahidrofurano o metiltetrahidrofurano, o una mezcla de un éter tal como tetrahidrofurano y un alcohol tal como etanol, opcionalmente en presencia de un aditivo, por ejemplo, un haluro alcalino tal como cloruro de litio, a temperaturas adecuadas, por ejemplo, en el intervalo de -20 a 40 °C, por ejemplo, de 0 a 25 °C. Como alternativa, la reducción también se puede conseguir mediante hidrogenación en presencia de catalizadores metálicos adecuados tales como Pd/C.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula (II-a)**

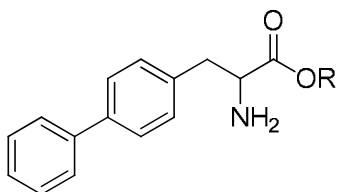


30 (II-a)**

se reduce utilizando borohidruro de sodio para obtener el compuesto de fórmula (I-a)*

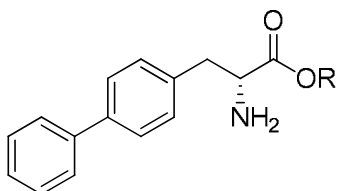


35 En una **tercera** realización de este, de acuerdo con el ESQUEMA 2** y el ESQUEMA 2**-a, paso e*, el compuesto obtenido de fórmula (III), o una sal de este



(III)

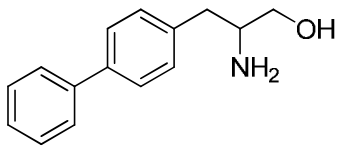
preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



(III-a)

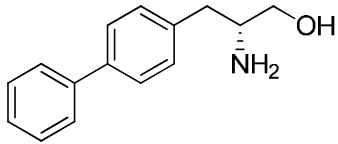
donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

se convierte en un compuesto de fórmula (I*), o una sal de este



(I*)

preferentemente un compuesto de fórmula (I*-a), o una sal de este

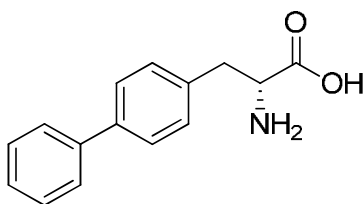


(I*-a)

mediante un proceso que comprende la reducción del compuesto de fórmula (III) en presencia de un agente reductor.

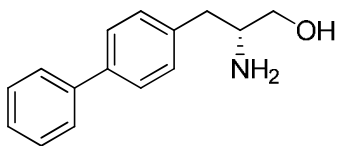
En una realización, la reducción se lleva a cabo tal como se ha descrito anteriormente para la reacción de reducción de acuerdo con el ESQUEMA 2 y el ESQUEMA 2-a, paso e.

En una realización preferida de este, el compuesto de fórmula (III-a)*



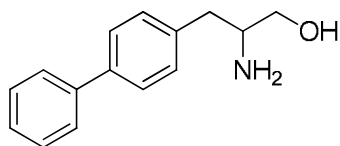
(III-a)*

se activa mediante una reacción con cloroformiato de isobutilo en presencia de *N*-metilmorfolina, seguida de una reducción con borohidruro de sodio para obtener el compuesto de fórmula (I*-a)



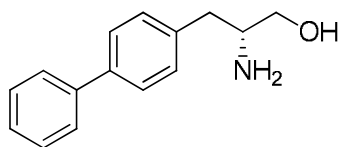
(I*-a)

En una realización adicional de este, de acuerdo con el ESQUEMA 2** y el ESQUEMA 2**-a, paso d*, el compuesto de fórmula (I*) que se acaba de obtener, o una sal de este



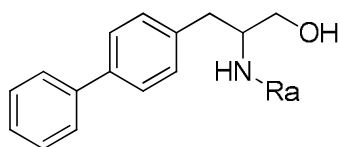
(I*)

preferentemente el compuesto de fórmula (I*-a), o una sal de este



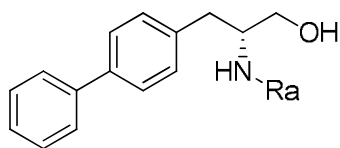
(I*-a)

se convierte en un compuesto de fórmula (I), o una sal de este



(I)

preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este

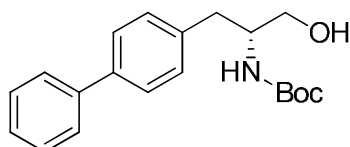


(I-a)

donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno,

mediante un proceso que comprende la introducción de un grupo protector de nitrógeno Ra.

En una realización, el compuesto de fórmula (I-a) es de fórmula (I-a)*



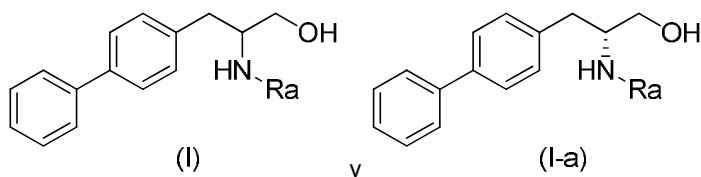
(I-a)*

el cual se obtiene mediante la reacción del compuesto de fórmula (I*-a) con dicarbonato de di-*tert*-butilo.

En una realización, la introducción del grupo protector de nitrógeno Ra se lleva a cabo tal como se ha descrito anteriormente para esta reacción de acuerdo con el ESQUEMA 2 y el ESQUEMA 2-a, paso d.

Reacciones de acuerdo con el ESQUEMA 3 y el ESQUEMA 3-a:

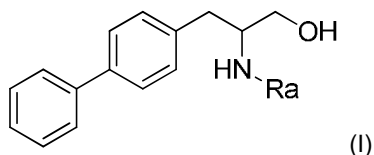
En el **primer aspecto** de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) y (I-a), respectivamente,



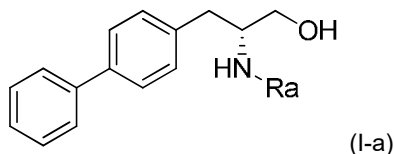
donde Ra es un grupo protector de nitrógeno, obtenido como resultado de la reacción de la transaminasa y los pasos de reacción representados en el ESQUEMA 2 y ESQUEMA 2* y ESQUEMA 2*-a, y ESQUEMA 2** y ESQUEMA 2**-a, respectivamente, se puede convertir a continuación en un compuesto de fórmula (VII) y (VII-a),

respectivamente, o sales de estos, y a continuación se puede convertir además en el profármaco inhibidor de NEP sacubitrilo, mediante una secuencia de reacciones tal como se muestra en el ESQUEMA 3 y ESQUEMA 3-a, respectivamente.

5 Por consiguiente, en una realización de este, el compuesto obtenido de fórmula (I), o una sal de este,

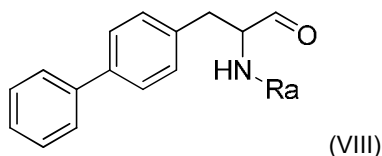


10 preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este

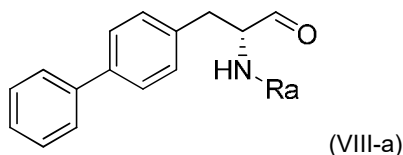


donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno,

15 se hace reaccionar mediante un proceso que comprende una reacción de oxidación mediada por TEMPO o una oxidación con peryodinano de Dess-Martin para obtener un compuesto de fórmula (VIII), o una sal de este,



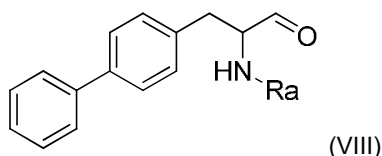
20 preferentemente un compuesto de fórmula (VIII-a), o una sal de este



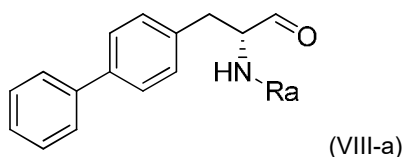
donde en ambas fórmulas Ra es hidrógeno o un grupo protector de nitrógeno.

25 Tal reacción del compuesto de fórmula (I), o más específicamente de fórmula (Ia), para obtener el aldehído correspondiente, se lleva a cabo utilizando una oxidación mediada por TEMPO (remítase, por ejemplo, a WO 2008/031567 o WO 2014/032627, páginas 24-25) o utilizando condiciones de reacción alternativas, tales como una oxidación con peryodinano de Dess-Martin (remítase, por ejemplo, a WO 2008/136561).

30 En una realización adicional de este, el compuesto obtenido de fórmula (VIII), o una sal de este,

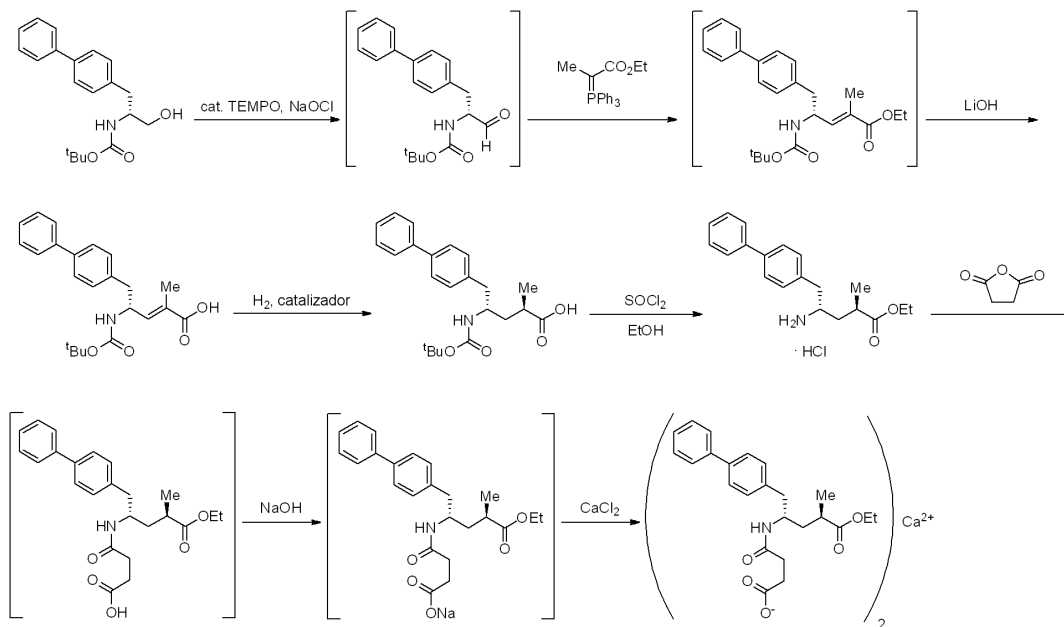


35 preferentemente un compuesto de fórmula (VIII-a), o una sal de este



se hace reaccionar adicionalmente para preparar el éster etílico del ácido *N*-(3-carboxil-1-oxopropil)-(4*S*)-(p-fenilfenilmetil)-4-amino-(2*R*)-metilbutanoico, o una sal de este.

5 Preferentemente, dicha reacción comprende los siguientes pasos o pasos análogos a estos (remítase también a WO 2008/031567 o WO 2014/032627, páginas 24-25):



10 Después de la oxidación con TEMPO mencionada anteriormente, el aldehído de fórmula (VIII-a) se somete a una reacción de Wittig con carboxietilidientrifilfosforano para proporcionar el éster etílico del ácido (*R*)-5-bifenil-4-il-4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-metilpent-2-enoico. El éster o, después de la saponificación del éster, el correspondiente ácido libre, el ácido (*R*)-5-bifenil-4-il-4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-metilpent-2-enoico, se hidrogena a continuación en presencia de un catalizador, a la vez que se produce preferentemente el diastereoisómero preferido con una selectividad elevada.

15 La desprotección de la funcionalidad de nitrógeno, es decir, la eliminación del grupo Boc, y si es necesaria la reintroducción del grupo de éster etílico y el acoplamiento posterior con anhídrido succínico proporcionan el compuesto que es el profármaco inhibidor de NEP deseado o una sal de este. Opcionalmente, el éster se puede saponificar para obtener el ácido libre, lo cual proporciona el compuesto que es el fármaco inhibidor de NEP.

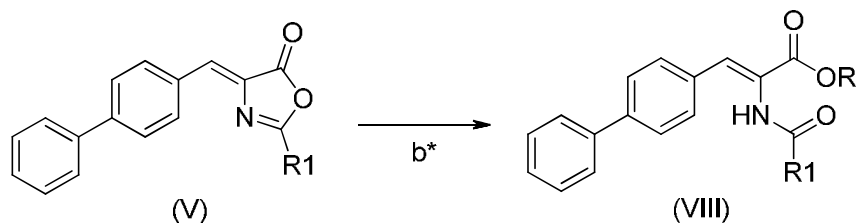
Reacciones de acuerdo con el ESQUEMA 4 y el ESQUEMA 4-a:

20

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un proceso de acuerdo con el ESQUEMA 4 y el ESQUEMA 4-a:

25 El paso de reacción a tanto en el ESQUEMA 4 como en el ESQUEMA 4-a es idéntico al paso de reacción a en el ESQUEMA 1 y el ESQUEMA 1-a, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente con más detalle.

El paso de reacción b*,



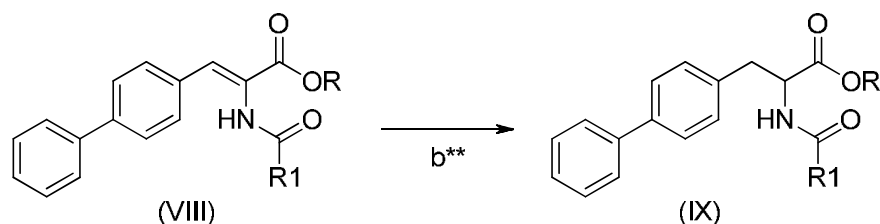
30

donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido y R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

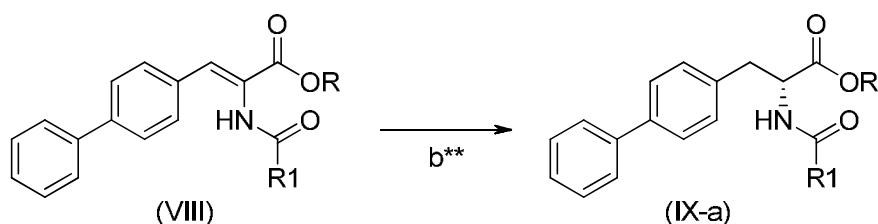
es una reacción de apertura de anillo, donde el compuesto de fórmula (V) se trata con agua o un alcohol R-OH para proporcionar el compuesto de fórmula (VIII) de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica y que se describen, por ejemplo, en WO 2004/002977 (página 17, Esquema 2), en WO 2011/035569 (para la reacción con agua, páginas 4-5) y WO 2013/026773 (Esquema 1, segundo paso), los cuales se incorporan a la presente por referencia.

Si R es hidrógeno o se desea otro sustituyente, se puede introducir un grupo protector de carboxilo de acuerdo con los procedimientos expuestos anteriormente en la presente.

El paso de reacción b**



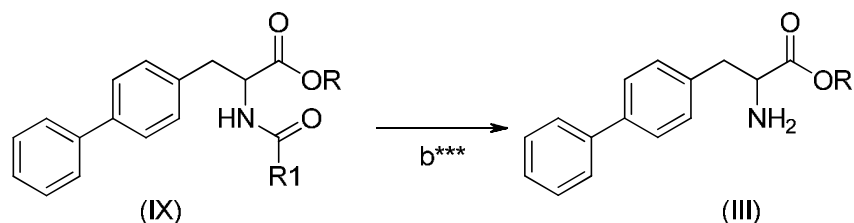
preferentemente



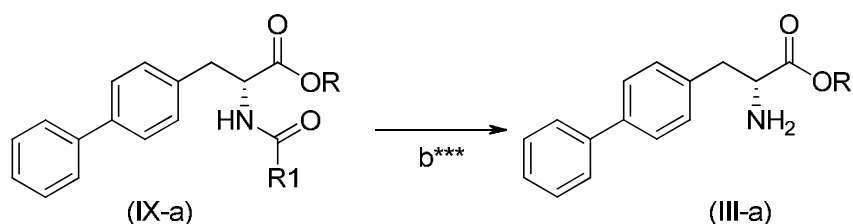
donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido y R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo,

es una reacción de reducción, donde el compuesto de fórmula (VIII) se reduce para proporcionar el compuesto de fórmula (IX) y (IX-a), respectivamente, de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica y que se describen, por ejemplo, en *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 308-323, WO 02/04466, WO 2009/090251 (Sección B.3.3 o C.2), WO 2011/035569 (paso b) y WO 2013/026773 (utilizando hidrogenación asimétrica en presencia de un catalizador), los cuales se incorporan a la presente por referencia.

El paso de reacción b***



preferentemente



donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) opcionalmente sustituido y R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, preferentemente un grupo alquilo C₁-C₇,

comprende a continuación la eliminación del grupo acilo del compuesto (IX) para proporcionar el grupo amino libre en el compuesto (III) de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica y que se describen, por ejemplo, en *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 308-323 y CN101362708A, los cuales se incorporan a la presente por referencia.

La reacción tiene lugar preferentemente en presencia de un ácido inorgánico acuoso, por ejemplo, un ácido halhídrico tal como ácido clorhídrico, en un disolvente o mezcla de disolventes que sea adecuado, por ejemplo, un alcohol tal como metanol, o un éter tal como 1,4- dioxano, o un ácido carboxílico tal como ácido acético, y/o agua, a temperaturas preferidas comprendidas en el intervalo desde 0 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 20 a 100 °C; o un ácido orgánico, por ejemplo, un ácido sulfónico tal como ácido metanosulfónico, en un disolvente adecuado, por ejemplo, un alcohol tal como metanol, a temperaturas preferidas comprendidas en el intervalo desde 50 °C hasta la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, por ejemplo, de 60 a 70 °C.

El paso de reacción d tanto en el ESQUEMA 4 como en el ESQUEMA 4-a, a saber, la introducción del grupo protector de nitrógeno Ra en el compuesto de fórmula (III) para proporcionar el compuesto de fórmula (II), es idéntico al paso de reacción d en el ESQUEMA 2 y el ESQUEMA 2-a, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente con más detalle, y de todos modos es muy conocido en la técnica.

El paso de reacción e tanto en el ESQUEMA 4 como en el ESQUEMA 4-a, a saber, la reducción del grupo carboxílico en el compuesto de fórmula (II) para obtener el compuesto de tipo aminoalcohol protegido de fórmula (I), es idéntico al paso de reacción e en el ESQUEMA 2 y el ESQUEMA 2-a, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente con más detalle. También se describe una reacción similar en WO 2008/138561 (página 36), que se incorpora a la presente por referencia.

El paso de reacción f y los pasos posteriores tanto en el ESQUEMA 4 como en el ESQUEMA 4-a, a saber, la oxidación del compuesto de tipo aminoalcohol protegido de fórmula (I) para obtener el aldehído correspondiente de fórmula (VII) y la transformación posterior para obtener el profármaco inhibidor de NEP sacubitrilo, son idénticas a la secuencia de reacciones tal como se representa en el ESQUEMA 3 y el ESQUEMA 3-a, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente con más detalle y de todos modos son muy conocidas en la técnica.

Otras realizaciones:

En cualquiera de los procesos mencionados anteriormente de acuerdo con los ESQUEMAS 1 a 4-a, en una realización, R1 es un grupo protector de nitrógeno seleccionado entre alquilo C₁-C₆, que no está sustituido o está mono-, di- o trisustituido con tri-(alquil C₁-C₆)-silil(alcoxi C₁-C₇), arilo C₆-C₁₀, o un grupo heterocíclico que es un sistema anular mono-, bi- o tricíclico con de 5 a 14 átomos anulares y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, S, S(O) o S(O)₂, donde el anillo de arilo o el grupo heterocíclico no está sustituido o está sustituido con uno, dos o tres residuos, seleccionados del grupo constituido por alquilo C₁-C₇, hidroxilo, alcoxi C₁-C₇, alcanoiloxi C₂-C₈, halógeno, nitro, ciano y CF₃;

(aril C₆-C₁₀)-(alcoxi C₁-C₂)carbonilo; (alquénilo C₁-C₁₀)carbonilo; (alquil C₁-C₆)carbonilo; (aril C₆-C₁₀)carbonilo; (alcoxi C₁-C₆)carbonilo; (aril C₆-C₁₀)-(alcoxi C₁-C₆)carbonilo; alilo; cinamilo; sulfonilo; sulfenilo; succinimidilo y sililo,

donde cada grupo sililo es un grupo -SiR₁₁R₁₂R₁₃, donde R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son, independientemente entre sí, alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o fenil-(alquilo C₁-C₄).

En una realización preferida de este, R1 es (alcoxi C₁-C₇)carbonilo, especialmente *tert*-butoxicarbonilo (Boc).

En cualquiera de los esquemas de reacción mencionados anteriormente, cualquiera de los compuestos quirales obtenidos (I), (II), (III), (VII) y (IX) representados sin una configuración específica en el átomo de carbono que contiene el grupo amino se puede resolver para obtener el enantiómero puro correspondiente de fórmula (Ia), (II-a), (III-a), (VII-a) o (IX-a)

utilizando métodos habituales para la resolución de enantiómeros a partir de mezclas de enantiómeros (tales como racematos), por ejemplo, mediante una cristalización selectiva (por ejemplo, mediante sales diastereoméricas) a partir de soluciones o emulsiones o cromatografía quiral. Tales métodos son muy conocidos en la técnica.

5 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Abreviaturas utilizadas:

10

Ac., ac. acuoso

Ac acetilo

15

Bu butilo

CDI *N,N*-carbonildiimidazol

Et etilo

20

h hora(s)

Me metilo

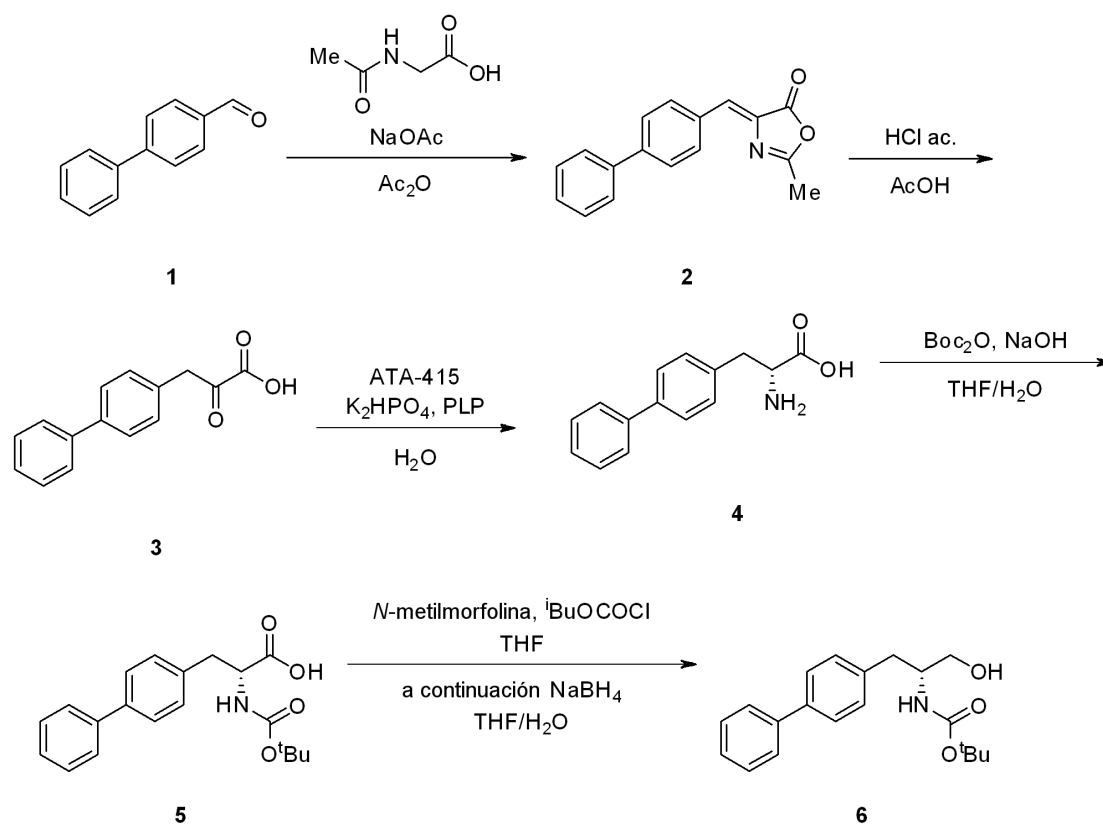
25

min minuto(s)

Ph fenilo

Visión general I

30



Ejemplo 1: Elaboración de (Z)-4-([1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)-2-metiloxazol-5(4H)-ona **2**

Una suspensión de bifenil-4-carboxaldehído **1** (por ejemplo, Sigma-Aldrich, n.º de catálogo B34680, n.º de CAS 3218-36-8) (25,1 g, 135,0 mmol), *N*-acetilglicina (16,2 g, 138,3 mmol) y acetato de sodio anhidro (11,1 g, 135,3 mmol) en anhídrido acético (250 mL) se calentó hasta 110-120 °C y se agitó a esta temperatura durante 10 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 5 °C y los sólidos precipitados se separaron por filtración, se lavaron con éter diisopropílico frío y se secaron a 50 °C al vacío para obtener el producto **2** como un sólido de color amarillo-naranja (36,5 g, cuantitativo). El producto crudo obtenido se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Ejemplo 2: Elaboración del ácido 3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oxopropanoico **3**

Una suspensión de (Z)-4-([1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)-2-metiloxazol-5(4H)-ona **2** (20,0 g, 75,96 mmol) en ácido acético (60 mL) y HCl acuoso al 37 % (140 mL) se calentó hasta 80-100 °C y se agitó a esta temperatura durante 10 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y a continuación se añadió agua (200 mL). Los sólidos precipitados se separaron por filtración, se lavaron con agua fría y se secaron a 50 °C al vacío para obtener el producto **3** como un sólido naranja (9,83 g, 53,9 % de rendimiento).

modo positivo 258,1 modo negativo 239,2 [M - H]⁻.

Ejemplo 3: Ácido (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoico **4**

Variante a)

Se disolvió clorhidrato de isopropilamina (19,95 g, 208,8 mmol) en una solución acuosa de K₂HPO₄ 67 M (210 mL; pH 9,39) y a continuación se añadió piridoxal 5'-fosfato (PLP) (54 mg). El valor del pH se ajustó hasta un pH de 9 mediante la adición de isopropilamina. Se suspendió el ácido 3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oxopropanoico **3** (1,00 g, 4,167 mmol) en 200 mL de esta solución tampón y se agitó durante 5 min a 40 °C y 180 rpm. Se añadió la transaminasa ATA-415 (34 mg; comercializada por Codexis, Inc., Redwood City, CA, EE. UU.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se centrifugó, el sólido se suspendió de nuevo en agua (5 mL) y se filtró. El sólido blanco resultante se secó al vacío para obtener el producto **4** (1,13 g, 90 % de rendimiento) como la sal correspondiente de cloruro de isopropilamonio.

(se determinó en forma de clorhidrato); pureza enantiomérica (HPLC): > 99 %.

Variante b)

Se disolvió clorhidrato de isopropilamina (19,95 g, 208,8 mmol) en una solución acuosa de K₂HPO₄ 67 M (105 mL; pH 9,39) y a continuación se añadió piridoxal 5'-fosfato (PLP) (27 mg). El valor del pH se ajustó hasta un pH de 9 mediante la adición de isopropilamina, para obtener la solución tampón A. Se suspendió el ácido 3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oxopropanoico **3** (80 mg, 0,333 mmol) en 2 mL de la solución tampón A y se agitó durante 10 min a 40 °C. El valor del pH se ajustó hasta un pH de 8,15 mediante la adición de isopropilamina. Se disolvió clorhidrato de isopropilamina (4,75 g, 49,70 mmol) y piridoxal 5'-fosfato (PLP) (6,25 mg) en tampón de trietilamina 0,1 M (25 mL; pH 7,0), para obtener la solución tampón B. Se disolvió la transaminasa ATA-032 (6,4 mg; comercializada por Codexis) en la solución tampón B (640 µL), se agitó a 30 °C durante 5 min y se centrifugó. Se añadió la solución de transaminasa ATA-032 (100 µL) y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C y 180 rpm durante 17 h. El análisis de la mezcla de reacción por HPLC indicó una conversión de un 100% y un ee > 99 %.

Datos físicos: remítase a la variante a)

Variante c)

Se añade lentamente ácido sulfúrico al 98 % (45,0 g, 450 mmol, 0,54 equiv.) a agua (300 g), seguido de K₂HPO₄ · 3 H₂O (47,5 g, 208 mmol, 0,25 equiv.) y el compuesto **3** (200 g, 832 mmol, 1,00 equiv.). A la suspensión resultante se le añade una solución acuosa de isopropilamina al 70 % (147,6 g, 1748 mmol, 2,10 equiv.). Después de calentar hasta 45 °C, el pH se ajusta hasta un pH de 8,8-8,9, a continuación se añade Tween 20 (30,0 g) en agua (70,0 g). Se añade PLP monohidratado (1,68 g, 6,80 mmol, 0,008 equiv.) y a continuación se ajusta el pH a 8,5-8,6. Se añade una suspensión de ATA-032 (2,00 g) en una solución tampón de pH 8 (40 mL, preparada a partir de K₂HPO₄ · 3 H₂O y agua) y la mezcla de reacción se agita a 41 °C durante 18 h. Se añade una solución acuosa de ácido sulfúrico 1 M (1270 g) y la mezcla de reacción se calienta posteriormente a 95 °C y se mantiene a esta temperatura durante 10 h. Después de enfriar hasta 25 °C, los sólidos se separan por filtración y la masa húmeda retenida sobre el filtro se lava con agua (1400 mL), una mezcla de una solución acuosa de K₂HPO₄ 3 H₂O al 1% (1400 mL) y 2-butanona (320 g) y 2-butanona (640 g), a continuación se seca para obtener el compuesto **4**.

Datos físicos: remítase a la variante a)

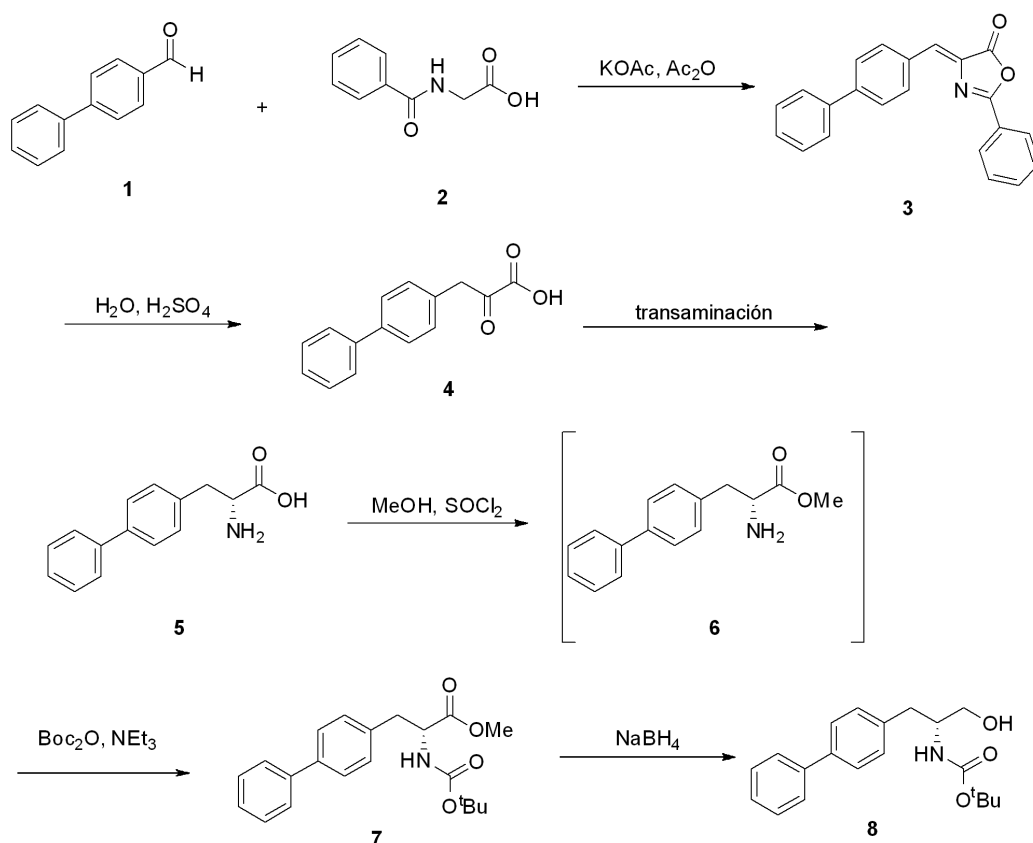
Ejemplo 4: Elaboración del ácido (*R*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico **5**

A una suspensión del ácido (*R*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoico **4** (0,9 g, 2,996 mmol; como la sal correspondiente de cloruro de isopropilamonio) en tetrahidrofurano (9 mL) y agua (9 mL) a temperatura ambiente, se añadió una solución de anhídrido de Boc (0,91 g, 4,103 mmol) en tetrahidrofurano (2 mL), seguida de una solución de hidróxido de sodio (335 mg, 8,206 mmol) en agua (2 mL). La solución transparente resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h, a continuación se añadió HCl acuoso al 10 % para ajustar el valor del pH hasta un pH de 4. Los disolventes orgánicos se eliminaron al vacío y el residuo acuoso se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para obtener el producto **5** (1,28 g, cuantitativo) como un sólido beige.

Ejemplo 5: Elaboración de (*R*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-hidroxiopropan-2-il)carbamato de *tert*-butilo **6**

A una solución de ácido (*R*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico **5** (1,28 g, que corresponden a 2,996 mmol) en tetrahidrofurano (8 mL) a -15 °C, se añadió cloroformiato de isobutilo (539 mg, 3,749 mmol), seguido de *N*-metilmorfolina (402 mg, 3,937 mmol). Se formó un precipitado y, después de agitar a -15 °C durante 30 min, el precipitado se separó por filtración y a continuación se lavó la masa húmeda retenida sobre el filtro con THF. El filtrado se añadió en 1 hora a una solución de borohidruro de sodio (296 mg, 7,499 mmol) en agua (4 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h, a continuación se añadió agua (15 mL) y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el producto crudo. La purificación mediante cromatografía (gel de sílice, heptanos/acetato de etilo) proporcionó el producto **6** (0,74 g, 75 % de rendimiento en dos pasos) como un sólido blanco.

modo positivo 350,3 [M + Na]⁺.

Visión general II:**Ejemplo 6: Síntesis de (*Z*)-4-([1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)-2-benciloxazol-5(4*H*)-ona **3**:**

En un reactor, se introduce [1,1'-bifenil]-4-carbaldehído **1** (90,0 g, 493,9 mmol, 1,0 equiv.), ácido 2-benzamidoacético **2** (106,2 g, 592,7 mmol, 1,2 equiv.), acetato de potasio (19,4 g, 197,7 mmol, 0,4 equiv.) y tolueno (720 mL). La mezcla de reacción se calienta hasta 55-65 °C, a continuación se añade anhídrido acético (32,6 mL, 345,8 mmol, 0,6 equiv.) en 1 h, lo cual conduce a la formación de una suspensión blanca. Después de agitar durante 2 h, la mezcla de reacción se enfría hasta 45-55 °C en 1 h. Se añaden cristales que actúan como núcleos de cristalización y la mezcla de reacción se agita durante 1 h más. Se añade más anhídrido acético (107,2 mL, 113,6 mmol, 2,4 equiv.) en 2 h, a continuación se agita

durante 6 h más. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfría hasta 15-25 °C en 2,5 h, y los sólidos se separan por filtración. La masa húmeda retenida sobre el filtro se lava con tolueno (90 mL, dos veces) y a continuación se seca para obtener el compuesto **3**.

5 Ejemplo 7: Síntesis del ácido 3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oxopropanoico **4**:

10 En un reactor, se introduce el compuesto **3**, ácido sulfúrico acuoso al 68 % (803 mL, 8,85 mol, 18,0 equiv. respecto al compuesto **1**) y ácido acético (576 mL). La mezcla de reacción se calienta hasta 95-105 °C y se agita durante 10 h más. La mezcla de reacción se enfría posteriormente hasta aproximadamente 25 °C en 5 h. Se añade éter *tert*-butil metílico (778 mL) en 2 h y la mezcla de reacción se agita adicionalmente durante 3 h. Los sólidos se separan por filtración y la masa húmeda retenida sobre el filtro se lava con agua (500 mL), una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio al 0,2 % (300 mL) y agua (300 mL), a continuación se seca para obtener el compuesto **4**.

15 Ejemplo 8: Síntesis del ácido (*R*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoico **5**:

20 Se añade lentamente ácido sulfúrico al 98 % (45,0 g, 450 mmol, 0,54 equiv.) a agua (300 g), seguido de $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ (47,5 g, 208 mmol, 0,25 equiv.) y el compuesto **4** (200 g, 832 mmol, 1,00 equiv.). A la suspensión resultante se le añade una solución acuosa de isopropilamina al 70 % (147,6 g, 1748 mmol, 2,10 equiv.). Después de calentar hasta 45 °C, el pH se ajusta hasta un pH de 8,8-8,9, a continuación se añade Tween 20 (30,0 g) en agua (70,0 g). Se añade PLP monohidratado (1,68 g, 6,80 mmol, 0,008 equiv.) y a continuación se ajusta el pH a 8,5-8,6. Se añade una suspensión de ATA-032 (2,00 g) en una solución tampón de pH 8 (40 mL, preparada a partir de $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ y agua) y la mezcla de reacción se agita a 41 °C durante 18 h. Se añade una solución acuosa de ácido sulfúrico 1 M (1270 g) y la mezcla de reacción se calienta posteriormente a 95 °C y se mantiene a esta temperatura durante 10 h. Después de enfriar hasta 25 °C, los sólidos se separan por filtración y la masa húmeda retenida sobre el filtro se lava con agua (1400 mL), una mezcla de una solución acuosa de $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ al 1% (1400 mL) y 2-butanona (320 g) y 2-butanona (640 g), a continuación se seca para obtener el compuesto **5**.

25 Ejemplo 9: Síntesis del éster metílico del ácido (*R*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico **7**:

30 En un reactor, se introduce el compuesto **5** (20,00 g, 82,9 mmol, 1,0 equiv.) y metanol (160 mL). La suspensión resultante se calienta hasta 50 °C, a continuación se añade cloruro de tionilo (12,82 g, 107,7 mmol, 1,3 equiv.) gota a gota durante 30 min. Se continúa agitando durante 10 h a 50-55 °C, a continuación se añade trietilamina (29,36 g, 290,1 mmol, 3,5 equiv.) a 50 °C, seguida de tolueno (100 mL). Se elimina el metanol al vacío mediante destilación a 50 °C. La mezcla de reacción se enfría hasta 20 °C, a continuación se añade anhídrido de Boc (19,9 g, 91,2 mmol, 1,1 equiv.) y la reacción se agita adicionalmente a 20 °C durante 2 h. La reacción se desactiva mediante la adición de una solución acuosa de NaCl al 10 % (100 mL) y se separan las fases. La fase orgánica se lava con una solución acuosa de NaCl al 10 % (50 mL), a continuación se concentra parcialmente y se diluye con una fracción de heptano (120 mL) a 50 °C. La mezcla de reacción se enfría hasta 10 °C en 5 h y los sólidos formados se separan por filtración, se lavan con una fracción de heptano (20 mL) y se secan para obtener el compuesto **7**.

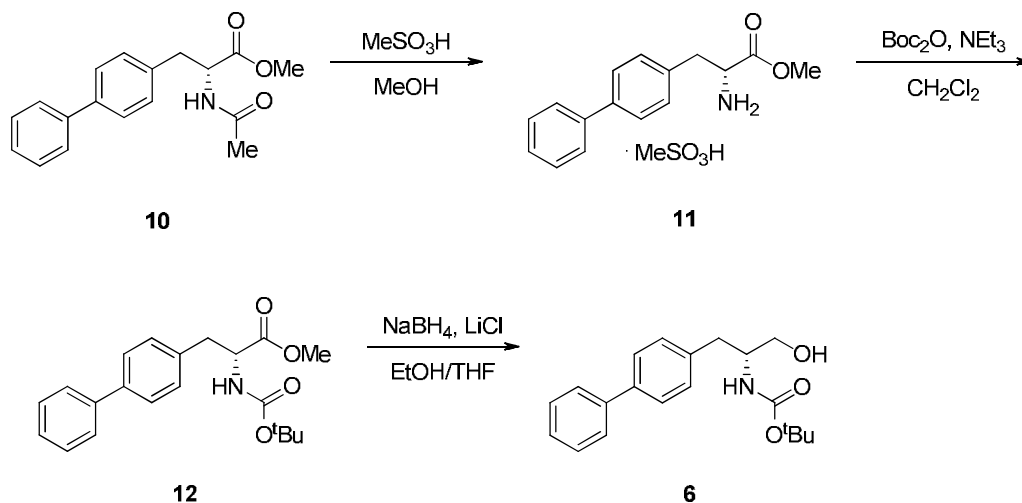
40 modo positivo 356,4 [M + H]⁺.

Ejemplo 10: Síntesis de (*R*)-(1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-hidroxiopropan-2-il)-carbamato de *tert*-butilo **8**:

45 A una solución del compuesto **7** (1,00 g, 2,81 mmol, 1,00 equiv.) en metil-THF (5,0 mL) a 0 °C, se añade borohidruro de sodio (319 mg, 8,43 mmol, 3,00 equiv.) a 0-5 °C para proporcionar una suspensión blanca. Se añade lentamente metanol (0,7 mL, 17,3 mmol, 6,15 equiv.), lo cual conduce al desprendimiento de gas. La mezcla de reacción se calienta lentamente hasta 20-25 °C, a continuación se agita a esta temperatura hasta obtener una conversión completa. La mezcla de reacción se enfría hasta 0 °C, a continuación se añade lentamente ácido cítrico acuoso al 40 % (6,0 mL), lo cual conduce a un enérgico desprendimiento de gas. Se separan las fases y la fase orgánica se lava con agua (3,0 mL). Se cambia el disolvente por tolueno (5,0 mL), a continuación se añade una fracción de heptano (5,0 mL) para hacer que precipite el compuesto **8**. El producto se separa por filtración, se lava con una fracción de heptano y se seca para obtener el compuesto **8**.

55

Visión general III:

Ejemplo 11: Elaboración de metanosulfonato de (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoato de metilo **11**

- 5 Una suspensión de (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-acetamidopropanoato de metilo **10** (0,190 g, 0,639 mmol) en metanol (1,2 mL) a 40 °C se trató con ácido metanosulfónico (0,070 g, 1,078 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta reflujo y se mantuvo a esta temperatura durante 21 h. Después de enfriar hasta 50 °C, se añadió una mezcla de isopropanol y heptanos 1:1 (10 mL), lo cual condujo a la formación de un precipitado blanco. La mezcla de reacción se enfrió adicionalmente hasta 0 °C, los sólidos se separaron por filtración y se lavaron con una mezcla fría de isopropanol y heptanos 1:1. Un secado a 50 °C al vacío proporcionó el producto **11** (0,150 g, 67 % de rendimiento) como un sólido gris.
- 10 modo positivo 256,2 [M + H]⁺.

Ejemplo 12: Elaboración de (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)propanoato de metilo **12**

- 15 A una suspensión de metanosulfonato de (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoato de metilo **11** (0,136 g, 0,378 mmol) en diclorometano (2 mL) a temperatura ambiente, se añadió trietilamina (0,054 mL, 0,395 mmol), seguida de anhídrido de Boc (0,093 mL, 0,401 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante 4,5 h. Tras la adición de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 mL) y acetato de etilo (5 mL), se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para obtener el producto **12** (0,148 g, cuantitativo) como un sólido beige.
- 20 modo positivo 356,3 [M + H]⁺.

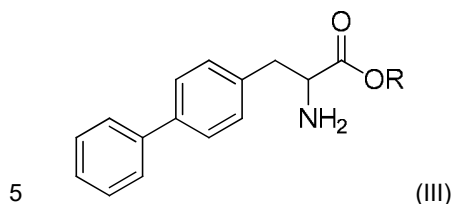
Ejemplo 8: Elaboración de (R)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-hidroxiopropan-2-il)carbamato de tert-butilo **6**

- 25 A una solución de (R)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)propanoato de metilo **12** (0,140 g, mmol) en una mezcla de etanol y tetrahidrofurano 1:1 (2 mL) a temperatura ambiente, se añadió cloruro de litio hidratado (0,183 g, mmol), seguido de borohidruro de sodio (0,109 g, mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 27 h. La mezcla de reacción se diluyó con una mezcla de etanol y tetrahidrofurano 1:1, los sólidos se separaron por filtración y se lavaron con una mezcla de etanol y tetrahidrofurano 1:1. El filtrado transparente se concentró al vacío para obtener el producto **6** (0,080 g, 67 % de rendimiento en dos pasos).
- 30

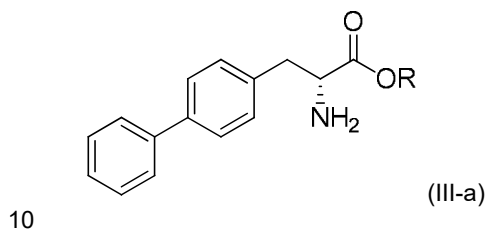
- 35 Para consultar los datos analíticos, remítase a la preparación del compuesto. **6** a partir del compuesto **5** descrita anteriormente.

REIVINDICACIONES

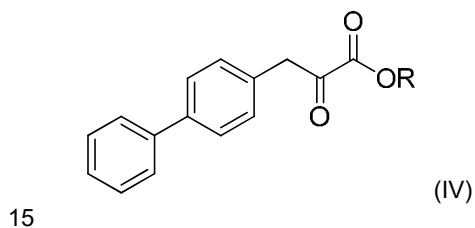
1. Un proceso para preparar un compuesto de fórmula (III), o una sal de este



preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, que comprende convertir un compuesto de fórmula (IV), o una sal de este,

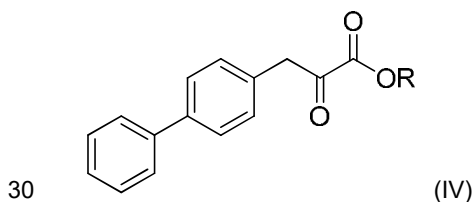


donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, en el compuesto de fórmula (III) poniéndolo en contacto con una ω -transaminasa selectiva para (*R*) en presencia de un dador de amina, donde la tasa de conversión del compuesto de fórmula (IV) en el compuesto de fórmula (III), preferentemente en el compuesto de fórmula (III-a), es superior a un 50 %.

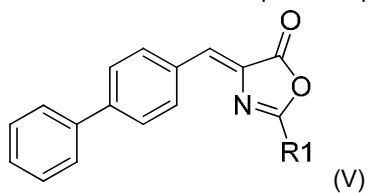
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el dador de amina es un dador de amina aquiral seleccionado del grupo constituido por alquilamina C₁-C₇ aquiral, cicloalquilamina C₃-C₈ aquiral, (aril C₆-C₁₀)-(alquil C₁-C₇)amina aquiral, alquildiamina C₁-C₇ aquiral, ácido aminoalcanoico C₁-C₇ aquiral y (aril C₆-C₁₀)-di(alquil C₁-C₇)amina aquiral.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el dador de amina aquiral es isopropilamina (2-aminopropano).

4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto de fórmula (IV), o una sal de este,

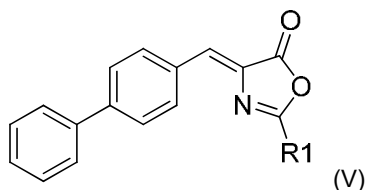


donde R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, se obtiene mediante un proceso que comprende la hidrólisis de un compuesto de fórmula (V),

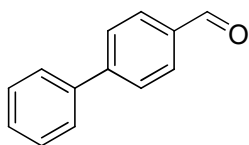


donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇), en condiciones ácidas o básicas para obtener un compuesto de fórmula (IV) donde R es hidrógeno y, opcionalmente, la introducción de un grupo protector de carboxilo R.

- 5 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el compuesto de fórmula (V),

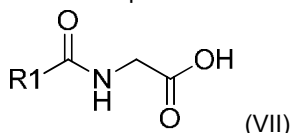


- 10 donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇), se obtiene mediante un proceso que comprende una reacción del compuesto de fórmula (VI)



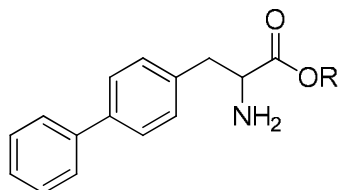
(VI)

con un compuesto de fórmula (VII) o una sal de este

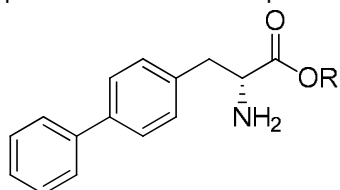


- 15 donde R1 es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇).

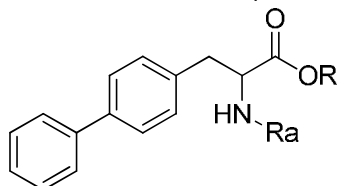
6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto de fórmula (III) obtenido, o una sal de este



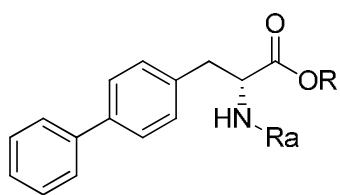
preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



- 20 donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, se convierte en un compuesto de fórmula (II), o una sal de este

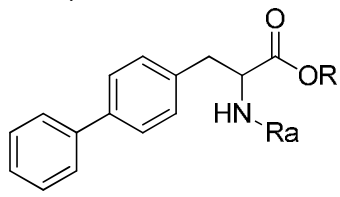


preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este

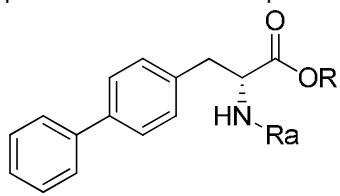


donde en ambas fórmulas, R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo y Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la introducción de un grupo protector de nitrógeno Ra.

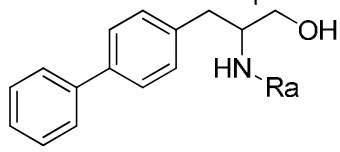
- 5 7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el compuesto de fórmula (II) obtenido, o una sal de este



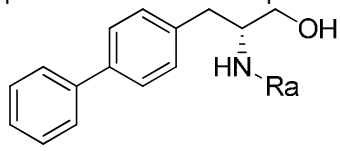
preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este



- 10 donde en ambas fórmulas, R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo y Ra es un grupo protector de nitrógeno, se convierte en un compuesto de fórmula (I), o una sal de este

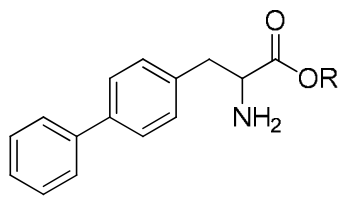


preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este

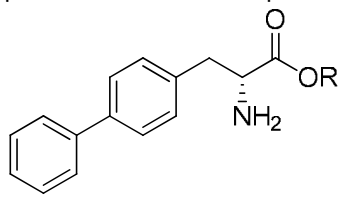


- 15 donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la reducción del compuesto de fórmula (II) en presencia de un agente reductor.

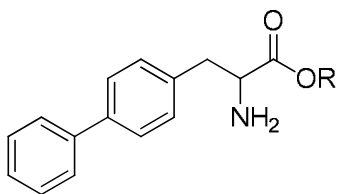
8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto de fórmula (III) obtenido, o una sal de este



- 20 preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este

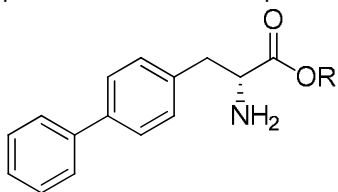


donde en ambas fórmulas R es hidrógeno, se convierte en primer lugar en un compuesto de fórmula (III), o una sal de este



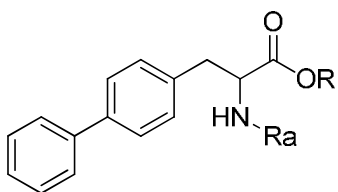
(III)

preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



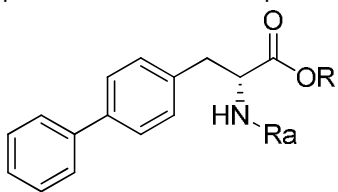
(III-a)

- 5 donde en ambas fórmulas R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇), mediante un proceso que comprende la reacción con un alcohol R-OH donde R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇), el cual a continuación se convierte posteriormente en un compuesto de fórmula (II), o una sal de este



(II)

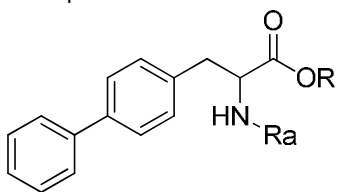
preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este



(II-a)

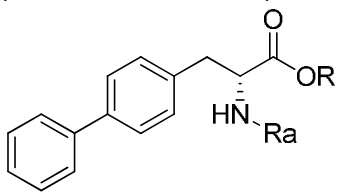
- 10 donde en ambas fórmulas R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) y Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la introducción de un grupo protector de nitrógeno Ra.

- 15 9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el compuesto de fórmula (II) obtenido, o una sal de este



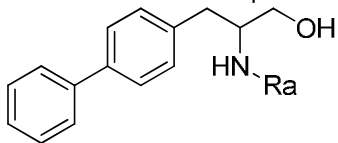
(II)

preferentemente un compuesto de fórmula (II-a), o una sal de este



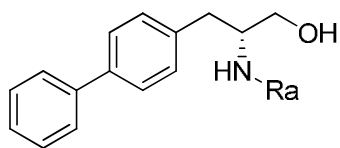
(II-a)

- 20 donde en ambas fórmulas R es alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o (aril C₆-C₁₀)-(alquilo C₁-C₇) y Ra es un grupo protector de nitrógeno, se convierte en un compuesto de fórmula (I), o una sal de este



(I)

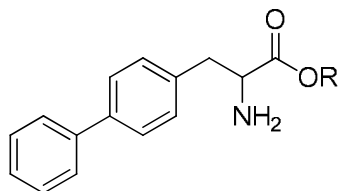
preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este



(I-a)

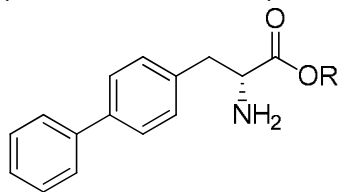
donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la reducción del compuesto de fórmula (II) en presencia de un agente reductor.

- 5 10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto de fórmula (III) obtenido, o una sal de este



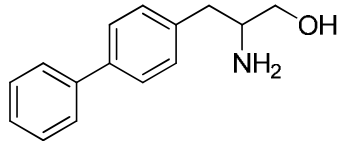
(III)

preferentemente un compuesto de fórmula (III-a), o una sal de este



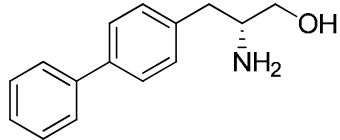
(III-a)

- 10 donde en ambas fórmulas R es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, se convierte en un compuesto de fórmula (I*), o una sal de este



(I*)

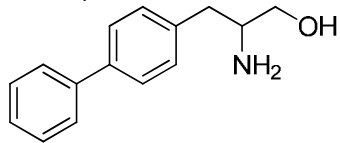
preferentemente un compuesto de fórmula (I*-a), o una sal de este



(I*-a)

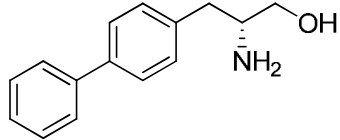
- 15 mediante un proceso que comprende la reducción del compuesto de fórmula (III) en presencia de un agente reductor.

11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto de fórmula (I*) obtenido, o una sal de este



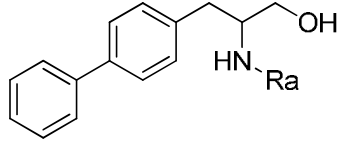
(I*)

preferentemente el compuesto de fórmula (I*-a), o una sal de este



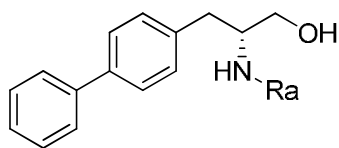
(I*-a)

- 20 se convierte en un compuesto de fórmula (I), o una sal de este



(I)

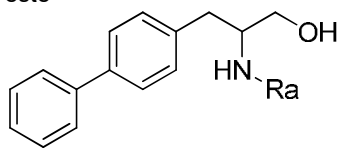
preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este



(I-a)

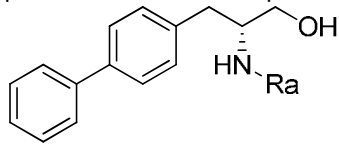
donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno, mediante un proceso que comprende la introducción de un grupo protector de nitrógeno.

- 5 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, 9 u 11, donde el compuesto de fórmula (I) obtenido, o una sal de este



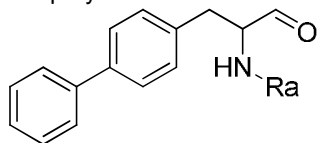
(I)

preferentemente un compuesto de fórmula (I-a), o una sal de este



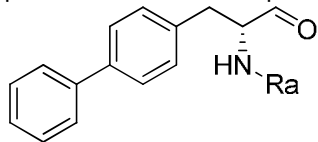
(I-a)

- 10 donde en ambas fórmulas Ra es un grupo protector de nitrógeno, se hace reaccionar mediante un proceso que comprende una reacción de oxidación mediada por TEMPO o una oxidación con peryodinano de Dess-Martin para obtener un compuesto de fórmula (VIII), o una sal de este,



(VIII)

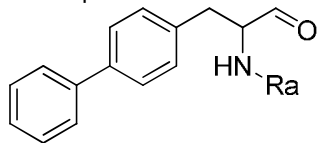
preferentemente un compuesto de fórmula (VIII-a), o una sal de este



(VIII-a)

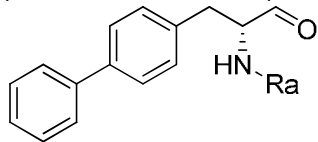
- 15 donde en ambas fórmulas Ra es hidrógeno o un grupo protector de nitrógeno.

13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el compuesto de fórmula (VIII) obtenido, o una sal de este



(VIII)

- 20 preferentemente un compuesto de fórmula (VIII-a), o una sal de este



(VIII-a)

se hace reaccionar adicionalmente para preparar el éster etílico del ácido *N*-(3-carboxil-1-oxopropil)-(4*S*)-(p-fenilfenilmetil)-4-amino-(2*R*)-metilbutanoico, o una sal de este.

- 25 14. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde Ra es un grupo protector de nitrógeno, en cada fórmula en la que está presente se selecciona entre alquilo C₁-C₆, que no está sustituido o está mono-, di- o trisustituido con tri-(alquil C₁-C₆)-silil(alcoxi C₁-C₇), arilo C₆-C₁₀, o un grupo heterocíclico que es un sistema anular mono-, bi- o tricíclico con de 5 a 14 átomos anulares y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, S, S(O) o S(O)₂, donde el anillo de arilo o el grupo heterocíclico no está sustituido o está sustituido con uno, dos o tres
30 residuos, seleccionados del grupo constituido por alquilo C₁-C₇, hidroxilo, alcoxi C₁-C₇, alcanoiloxi C₂-C₈, halógeno, nitro, ciano y CF₃;
(aril C₆-C₁₀)-(alcoxi C₁-C₂)carbonilo; (alqueniloxi C₁-C₁₀)carbonilo; (alquil C₁-C₆)carbonilo; (aril C₆-C₁₀)carbonilo; (alcoxi C₁-C₆)carbonilo; (aril C₆-C₁₀)-(alcoxi C₁-C₆)carbonilo; alilo; cinamilo; sulfonilo; sulfenilo; succinimidilo y sililo,

donde cada grupo sililo es un grupo -SiR₁₁R₁₂R₁₃, donde R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son, independientemente entre sí, alquilo C₁-C₇, arilo C₆-C₁₀ o fenil-(alquilo C₁-C₄).

15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, donde Ra como grupo protector de nitrógeno es (alcoxi C₁-C₇)carbonilo, preferentemente *tert*-butoxicarbonilo.