



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 484**

51 Int. Cl.:  
**C07D 241/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07730171 .1**

96 Fecha de presentación : **14.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2038260**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Síntesis estereoselectiva de (S)-1-metil-3-fenilpiperazina.**

30 Prioridad: **16.06.2006 EP 06115607**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.01.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.01.2011**

73 Titular/es: **N.V. ORGANON**  
**Kloosterstraat 6**  
**5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es: **Kemperman, Gerardus Johannes;**  
**Van Vliet, Michiel, Christian, Alexander y**  
**Schreuder Goedheijt, Marcel**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 349 484 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).

## SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE (S)-1-METIL-3-FENILPIPERAZINA

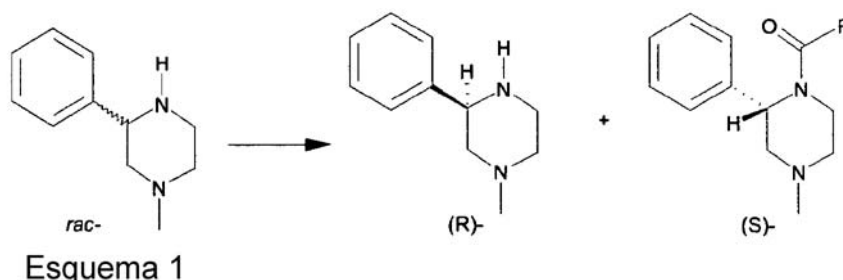
## Descripción

Esta invención se refiere a un nuevo material de partida y al uso del mismo en un método para preparar (S)-1-metil-3-fenilpiperazina o (R)-1-metil-3-fenilpiperazina mediante la hidrólisis enzimática de un éster de 1-metil-3-fenilpiperazina racémica.

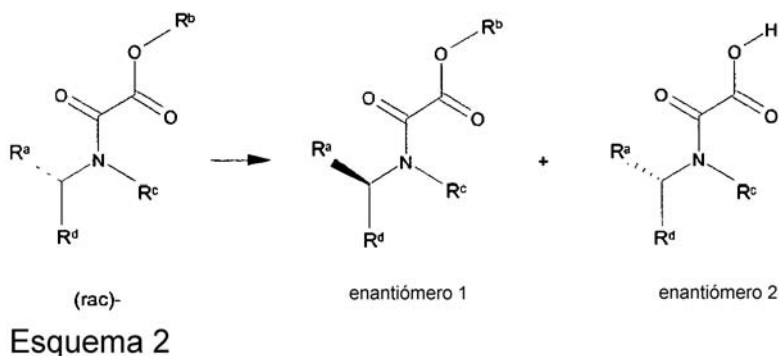
Para obtener un material de partida ópticamente activo de 1-metil-3-fenilpiperazina por la ruta de síntesis estereoselectiva para S-mirtazapina (Véase Wieringa *et al.*, WO2005/005410) es necesario un método eficaz de preparación de (S)-1-metil-3-fenilpiperazina de alta pureza enantiomérica. La biocatálisis es una excelente herramienta para la preparación de compuestos ópticamente activos. A menudo las enzimas presentan selectividad quimio-, enantio- y regio-selectividad en condiciones muy suaves. Además, la biocatálisis permite el uso de métodos que tienen pocos equivalentes en química orgánica. Un ejemplo de esto es que el consumo del enantiómero no deseado con enantioselectividad moderada de hasta el 99% de ee (exceso enantiomérico) se alcanza a expensas de algún rendimiento. La biocatálisis no siempre es absolutamente selectiva. Sin embargo, pueden obtenerse buenos resultados mediante la selección apropiada de una enzima seguida de una optimización que requiere el conocimiento del mecanismo subyacente. El resultado final puede ser menos complicado que un proceso químico convencional.

Los intentos para la acilación enzimática enantioselectiva de *rac*-1-metil-3-fenilpiperazina de acuerdo con el esquema 1 fracasaron ya que no se observó reacción a temperaturas por encima de 55°C usando el muy reactivo butirato de trifluoroetilo y grandes cantidades de diversas enzimas, a pesar de los ejemplos publicados de acilación enantioselectiva satisfactorios, con una combinación equilibrada de enzima y donador de acilo (Orsat, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1996 (118) 712; Morgan *et al.*; J. Org. Chem. 2000 (65) 5451; Breen, Tetrahedron: Asymmetry 2004 (15) 1427).

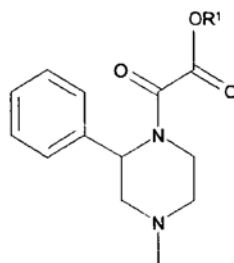
2



Se descubrió por Hu *et al.* (Org. Lett. 2005 (7) 4329) que era factible la resolución de aminas secundarias usando la hidrólisis enzimática de un grupo oxalamato (Esquema 2). Después de la separación del éster y los productos ácidos y de la escisión de los grupos oxalámicos pueden obtenerse ambos enantiómeros de las aminas. La única peculiaridad es el uso de un grupo éster oxalamato remoto para esta resolución, mientras el enlace amida de baja reactividad no se convierte



10 Esta invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1



en la que R<sup>1</sup> es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, bencilo o 2-haloetilo (tal como 2-cloro-etilo y 2,2,2-trifluoretilo), compuesto que es el único usado en un método nuevo para preparar por separado (S)- y (R)-1-metil-3-fenilpiperazina mediante la hidrólisis enzimática de un compuesto de este tipo. A pesar de que

15

Hu *et al.* observaron que la proteasa de *Streptomyces griseus* era menos útil para una fenilpiperidina, esta invención proporciona un método para preparar (S)- y (R)-1-metil-3-fenilpiperazina mediante hidrólisis enzimática del compuesto que se ha definido anteriormente seguido de la separación del producto de hidrólisis y de la escisión de los grupos oxalámicos, por lo que la proteasa de *Streptomyces griseus* se usa como una enzima para la hidrólisis enzimática.

El compuesto de partida puede usarse como un alquilo (C1-C3)-, bencil- o oxalamato de 1-metil-3-fenilpiperazina 2-haloetilo racémica o de cualquier grado de mezcla ópticamente activa para obtener (S)- o (R)-1-metil-3-fenilpiperazina de elevada pureza ópticamente activa. Alquilo (C1-C3) se refiere a metilo, etilo, n-propilo e isopropilo.

Usando un protocolo optimizado, actualmente puede obtenerse (S)-1-metil-3-fenilpiperazina con un rendimiento global del 36% al 99,8% de ee y una pureza del 98%.

La proteasa de *Streptomyces griseus* es una enzima de la amplia familia de las hidrolasas. Las hidrolasas son capaces de realizar reacciones en agua, pero también en disolventes orgánicos casi anhidros. Algunos ejemplos de hidrolasas son lipasas (hidrólisis de grasas), proteasas (hidrólisis de proteínas) y esterases (hidrólisis de ésteres).

El uso de la proteasa de *Streptomyces griseus* como hidrolasa tiene varias ventajas. Es una enzima relativamente estable que puede almacenarse en forma de soluciones acuosas concentradas o polvos liofilizados. La enzima no requiere ningún cofactor, que, si se necesitaran, no sólo sería poco atractivo económicamente, sino que muchos cofactores podrían ser más frágiles que la propia enzima. La enzima tiene un amplio sitio activo y es capaz de manejar el sustrato que se necesita para esta reacción, a pesar de que las pequeñas variaciones pueden dar diferencias drásticas en la velocidad de reacción. Por último, la enzima tiene alta estabilidad en mezclas de agua/codisolvente o incluso en disolventes orgánicos puros.

En la biocatálisis la selectividad de una reacción se expresa a menudo como la proporción enantiomérica o E. La proporción enantiomérica mantiene la relación entre los índices de reacción inicial de los dos enantiómeros a igual concentración ( $t = 0$  para la mayoría de las reacciones). La proporción enantiomérica puede calcularse en cualquier punto de la reacción si se

conocen dos de los tres parámetros siguientes: conversión, ee del producto y ee del sustrato. En circunstancias ideales, la E es constante durante la reacción. Hay varios supuestos en las fórmulas que no son siempre válidos. Además, en una conversión muy alta o muy baja, la E varía considerablemente con pequeñas variaciones de la conversión o en el ee. Esto significa que el valor se vuelve más sensible a la precisión de la medición. Dado que la selectividad no es nunca absoluta, al 100% de conversión se termina de nuevo con un racemato. Esto significa que los valores de E a menudo parecen descender hacia el final de la reacción. Por lo tanto, el E debe usarse como un valor indicativo y no como un valor absoluto. A menudo pueden usarse las siguientes reglas generales:

- E = 1-Sin selectividad, índices iguales para ambos enantiómeros
- E = 1-5-Selectividad baja. El alto ee sólo puede alcanzarse si se consume en la reacción el enantiómero no deseado y después sólo en conversiones >90%
- E = 5-25-Buenas posibilidades para un proceso mediante el consumo del enantiómero equivocado. El alto ee del producto sólo se obtiene a conversión baja.
- E = 25-100-Alto ee del sustrato, así como del producto a conversiones moderadas.
- E >100-Selectividad casi absoluta. A menudo la reacción "se detiene" al 50% de la conversión (disminución drástica de la velocidad). Posibilidades de resolución cinética dinámica para conseguir el 100% de ee con un rendimiento del 100%. No sólo el sustrato se obtiene con alto ee, sino que también el producto muestra alto ee en torno al rendimiento teórico (50%).

En una realización más específica, la invención proporciona el método como se ha definido anteriormente, por el que la hidrólisis se realiza en un medio sin tampón. La ausencia de la necesidad de añadir un tampón al medio de reacción no sólo simplifica el método, sino que incluso mejora el método obteniendo proporciones enantioméricas más altas. Sin estar sujeto a la teoría, se cree que el nitrógeno en la posición 1 en el anillo de piperizina contribuye a esto.

Una realización más específica de la invención es el uso en el método como se ha definido anteriormente del oxalato de 1-metil-3-fenilpiperazina

metilo junto con un medio que comprende tolueno o metil-*t*-butileter.

Otra realización específica de la invención es el uso en el método como se ha definido anteriormente del etiloxalato de 1-metil-3-fenilpiperazina junto con un medio que comprende ciclohexano.

- 5 Con la información en esta descripción un experto puede ahora además optimizar las condiciones para el método o encontrar alternativas cercanas del método mediante la selección de un medio adecuado, concentraciones y ésteres oxalamato.

#### Ejemplos

- 10 Hidrólisis enzimática de derivados de oxalamato de (m)etilo.

Los sustratos racémicos se prepararon por acilación de 1-metil-3-fenilpiperazina usando clorooxalato de metilo disponible en el mercado, proporcionando un oxalamato cristalino que pudo purificarse por recristalización. Se ensayaron una gama de proteasas disponibles en el mercado (tabla 1). Sólo la esperasa mostró alguna actividad, como se observó por el enriquecimiento de uno de los enantiómeros. La configuración absoluta se determinó por comparación con una muestra confirmada del (S)-enantiómero. Se realizó una breve exploración para las condiciones de reacción (tabla 2). Los valores E se calcularon en base a la conversión y del ee del material de partida y del producto. La conversión se estimó usando una pequeña impureza en el material de partida (ya presente en la piperizina de partida) como patrón interno.

Tabla 1: Exploración de proteasas en la resolución del oxalamato de etilo

enzima	ee (43 h)	ee (65 h)	ee (85 h)
1 ninguna	0	n.d.	-
2 0,1 ml de esperasa	5%	13%(R)	21% (R)
3 0,1 ml de everlasa	<1%	<1%	-
4 250 mg de polarzima	<1%	1%	-
5 25 mg de savinasa CLEA	2%	3%	-
6 25 mg de alcalasa CLEA	4%	6%	-
7 25 mg de proteinasa N (fluka)	<1%	1%	-

- 25 Condiciones: se cargaron 7 viales con enzima, 1 ml de solución oxamato (oxamato de 1-metil-3-fenilpiperazina de etilo 0,1 M en metil-*t*-butileter (MTBE)) y 2 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,3). En agitación durante 3 días a  $T_a$ , la reacción 2 se agitó durante otras 20 h a 40°C. Análisis por GC quiral.

Tabla 2: Breve exploración de condiciones para esperasa

	enzima	tampón	disolvente	ee	conv
1	0,25 ml de esperasa	0,5 M pH 9,0	MTBE	6%	3,3%
2	0,25 ml de esperasa	0,1 M pH 9,0	MTBE	15%	0% (?)
3	0,25 ml de esperasa	0,5 M pH 9,0	CAN	16,2%	17% (R, E = 10)
4	0,25 ml de esperasa	0,1 M pH 9,0	CAN	22%	40% (R)
5	0,25 ml de esperasa	0,1 M pH 8,2	MTBE	13%	7%
6	0,25 ml de esperasa	0,1 M pH 10	MTBE	16%	2%
7	1 ml de esperasa	0,1 M pH 9,0	MTBE	23%	<0
8	1 ml de alcalasa	0,1 M pH 9,0	MTBE	20%	<0

Condiciones: Se cargaron 8 viales con enzima, 1 ml de una solución de oxamato (oxamato de 1-metil-3-fenilpiperazina de etilo 0,1 M en MTBE o acetonitrilo (ACN)) y 2 ml de tampón fosfato. Se agitaron durante 18 h. Análisis por GC quiral.

5

Se realizó una exploración amplia de proteasa usando oxalamato de metilo en bruto y oxalamato de etilo relativamente puro (tabla 3). Un prototipo de esperasa CLEA no dio mejores resultados. Un grupo de otras enzimas en tampón tolueno/bicarbonato no mostró selectividad en absoluto (tabla 4).

10

Tabla 3: Exploración más extensa de proteasa para el oxalamato de (m)etilo

	enzima	m	material de partida	GC (ee de oxalamato)
1	Trypsin Novo	50 mg	Me*	0%
2	Proteasa Europa 2	50 mg	Me*	-3%
3	Proteasa Europa 7	50 mg	Me*	0
4	Proteasa Europa 12	50 mg	Me*	0
5	Esterasa Europa 2	50 mg	Me*	-3%
6	Esperasa CLEA	50 mg	Me*	11%
7	Esperasa CLEA	250 mg	Me*	12%
8	Alcalasa CLEA	50 mg	Me*	15%
9	Alcalasa CLEA	250 mg	Me*	43% (R)
10	Proteasa microb. Fluka	10 mg	Me*	37% (R)
11	Subtilisina A	10 mg	Me*	11%
12	Esperasa CLEA	250 mg	Et	4%
13	Alcalasa CLEA	250 mg	Et	9%

	enzima	m	material de partida	GC (ee de oxalamato)
14	Proteasa microb. Fluka	10 mg	Et	6%
15	Subtilisina A	10 mg	Et	<2%

Condiciones: Se cargaron 15 viales con enzima, 1 ml de solución de oxamato (oxamato 1-metil-3-fenilpiperazina de etilo (m) 0,1 M en MTBE) y 2 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 9,0). Se agitaron durante 18 h. Análisis por GC quiral.

Tabla 4: Exploración de enzimas en tolueno con tampón bicarbonato

E9/	Enzima	pH final	ee de sustrato restante
1	Alcalasa CLEA	8,0	0
2	Esperasa CLEA	8,1	0
3	Savinase CLEA	8,1	<3
4	Novo Subtilisina	8,1	<2
5	CaL-A CLEA	8,1	0
6	CaL-B CLEA	8,1	3
7	CR CLEA	8,3	0
8	Amano acilasa	8,4	2
9	Acilasa I	8,4	2
10	Alcalasa CLEA (pH	7,6	1

Condiciones para la Tabla 4: las enzimas secas (50 mg) se mezclaron con 1 ml de solución madre (oxalamato de 1-metil-3-fenilpiperazina metilo (16 g) en forma de un jarabe impuro en bruto se disolvió en 600 ml de tolueno) y 1 ml de tampón bicarbonato 0,2 M. Reacción a Ta durante 22 h.

Se obtuvo un buen resultado con la proteasa de *Streptomyces griseus*. La Tabla 5 muestra los resultados; en las condiciones correctas puede obtenerse un ee excelente para el enantiómero deseado.

Los mejores resultados se obtuvieron en un medio sin tampón, que usó el nitrógeno extra en el sustrato como base.

Incluso a un valor de pH <<7 se obtuvieron muy buenos resultados para esta proteasa.

Tabla 5: Exploración de condiciones para la proteasa de *S. griseus* y oxalamato

## de etilo

	Disolvente	pH final	ee	E estim.*
1	ACN al 90%/agua	7,3	0	-
2	ACN al 10%/agua	6,4	100%(S)	E = 60
3	ACN al 50%/agua	6,7	31% (S)	-
4	dioxano al 50%/agua	6,6	29% (S)	-
5	t-BuOH al 50%/agua	5,9	90% (S)	E = 27
6	MTBE al 50%/agua	5,9	aprox 98% (S)	E = 500
7	MTBE al 50%/tampón pH 8 0,1 M	7,1	50% (S)	E = 7

Condiciones: Se cargaron 7 viales con 8 mg de proteasa de *Streptomyces griseus*, 28 mg (0,1 mmol) de oxalamato de etilo oleoso y 2 ml del disolvente indicado. Se agitaron durante 20 h a Ta. Análisis por GC quiral.  
 \*Conversión estimada usando la impureza de 3,8 m.

La enzima se ensayó adicionalmente en un grupo de condiciones usando oxalamato de metilo y oxalamato de etilo (ahora puro) (tabla 6). Usando condiciones sin co-disolvente el oxalamato de metilo solidificó, dando como resultado una suspensión espesa con las limitaciones de difusión obvias que obstaculizaron la pureza óptica completa en una conversión relativamente alta. Sólo se necesitó una pequeña cantidad de la enzima.

Los ésteres 2 mostraron diferencias en las condiciones óptimas para la resolución.

Tabla 6: Condiciones de exploración adicional de proteasa de *S. griseus* y oxalamato de (m)etilo

	éster	mg de enzima	disolvente	pH final	ee (todo S)	E estim.*
1	Me	0,1	H <sub>2</sub> O	6,2	24%	alto
2	Me	1	H <sub>2</sub> O	6,0	97,4%	60
3	Me	10	H <sub>2</sub> O	6,0	95,2%	alto
4	Me	1	ACN al 5%	6,2	87%	9
5	Me	1	t-BuOH al 5%	6,0	89%	12
6	Me	1	acetona al 5%	6,1	77%	12
7	Me	1	MTBE	5,6	100%	alto
8	Et	0,1	H <sub>2</sub> O	6,3	91%	8,6
9	Et	1	H <sub>2</sub> O	6,2	100%	>21
10	Et	10	H <sub>2</sub> O	6,1	100%	> 12

	éster	mg de enzima	disolvente	pH final	ee (todo S)	E estim.*
11	Et	1	5% ACN	6,4	95,1%	12
12	Et	1	5% acetona	6,3	95,6%	9
13	Et	1	MTBE	6,0	49%	bajo? 5

Condiciones: se cargaron 13 viales con proteasa de *Streptomyces griseus*, 26/28 mg (0,1 mmol) de oxalamato de (m)etilo oleoso y 2 ml del disolvente indicado. Se agitaron durante 64 h a Ta. Análisis por GC quiral después de la basificación. \*Conversión estimada usando la impureza de 3,8 m.

Se ensayó una gama más de proteasas disponibles en el mercado (tabla 7). Para los 2 ésteres se usaron las condiciones óptimas de la tabla 6; éster metílico (ahora un sólido) en una mezcla bifásica de MTBE y éster etílico en forma de un aceite suspendido en agua pura. Durante este experimento el oxalamato de etilo oleoso también comenzó a solidificarse, lo que puede significar que los resultados prometedores de la tabla 6 (exp. 8) no serán reproducibles.

En la exploración enzimática sólo el éster etílico dio dos candidatos posibles, esto se ensayó adicionalmente con una carga enzimática más realista (tabla 8), a pesar de ello con poco éxito. La adición de una pequeña cantidad de ácido acético para mejorar la solubilidad del sustrato sólido no fue exitosa, a pesar de que la enzima parece trabajar a muy bajo pH.

Tabla 7: Exploración adicional de proteasa para oxalamato de (m)etilo

	éster	Enzima	disolvente	pH final	ee
1	Me	2,8 mg de Proteasa S. <i>griseus</i>	MTBE*	6,5	100% (S)
2	Me	10 mg de Subtilisina A Fluka	MTBE	6,3	0
3	Me	10 mg de Proteasa bact. Fluka	MTBE	6,0	aprox. al 5% (R)
4	Me	25 mg de proteinasa A. <i>melleus</i>	MTBE	6,4	0
5	Me	10 mg de proteasa B. <i>polimyxa</i>	MTBE	7,2	0

	éster	Enzima	disolvente	pH final	ee
6	Me	10 mg de proteasa <i>A. saitoi</i>	MTBE	6,5	0
7	Me	100 µl de <i>B. amiliquefaciens</i>	MTBE	6,1	0
8	Me	100 µl de Proteasa <i>A. oryzae</i>	MTBE	5,9	aprox. al 5% (S)
9	Me	100 µl de Esperasa	MTBE	6,4	0
10	Et	2,8 mg de Proteasa <i>S. griseus</i>	H <sub>2</sub> O*	6,5	100% (S)
11	Et	10 mg de Subtilisina A Fluka	H <sub>2</sub> O	6,8	0
12	Et	10 mg de Proteasa bact. Fluka	H <sub>2</sub> O	6,6	11% (S)
13	Et	25 mg de proteinasa <i>A. melleus</i>	H <sub>2</sub> O	6,5	56% (S)
14	Et	10 mg de proteasa <i>B. polimyxa</i>	H <sub>2</sub> O	7,0	0
15	Et	10 mg de proteasa <i>A. saitoi</i>	H <sub>2</sub> O	7,0	0
16	Et	100 µl de <i>B. amiliquefaciens</i>	H <sub>2</sub> O	6,5	0
17		100 µl de proteasa <i>A. oryzae</i>	H <sub>2</sub> O	6,4	57% (S)
18		100 µl de Esperasa	H <sub>2</sub> O	6,8	0

5 Condiciones: se cargaron 18 viales con 28 mg de oxalamato de etilo oleoso o 1 ml de una solución 0,1 M del oxalamato de metilo en MTBE/isopropanol al 5% (de lo contrario no soluble). Se añadió agua a 2 ml de volumen de reacción (teniendo en cuenta el volumen de la enzima). Cantidad indicada de enzima. \*Los Exp. 1 y 10 contienen 1 ml de tampón tris 0,1 M pH 8.

Tabla 8: Exploración de otros 2 candidatos de proteasa en oxalamato de etilo

	enzima	ácido	final	ee
1	2,5 mg de proteasa M Amano	0	suspensión	0
2	( <i>A. melleus</i> )	0,1 equiv. de HOAc	suspensión	0
3		0,2 equiv. de HOAc	suspensión	0
4		0,35 equiv. de HOAc	suspensión	-3%
5		0,5 equiv. de HOAc	limpio	+3%
6	10 µl de proteasa <i>Oryzae</i>	0	suspensión	-2%
7		HOAc 0,1 equiv. de	suspensión	3%

8	0,2 equiv. de HOAc	suspensión	3%
9	0,35 equiv. de HOAc	suspensión	0
10	0,5 equiv. de HOAc	suspensión	0

Condiciones: se cargaron 10 viales con 28 mg de oxalamato de etilo oleoso. Se añadió 1 ml de agua. Cantidad indicada de ácido acético para mejorar la solubilidad del sustrato.

5 Aumento de la reacción catalizada con proteasa de *S. griseus*.

El principal objetivo fue disminuir la carga de la enzima y aumentar la concentración de sustrato sin comprometer la enantiopureza final del producto. Durante las reacciones en agua sin tampón, el pH disminuyó considerablemente más allá del pH óptimo de la enzima. De modo que el primer ensayo fue una exploración de pH, usando un pH stat mientras se comparaba con la reacción sin tampón (tabla 9). Una reacción sin control de pH mostró un ee más alto en una primera etapa de la reacción. El ee del producto de ácido oxalámico aislado (enantiómero-R) fue también más alto, indicando una reacción mucho más selectiva (E más alto). Se observaron los mismos efectos se vieron con el oxalamato de etilo, pero la solidificación del sustrato complicó un poco la comparación de los resultados (tabla 10).

Tabla 9: Efecto del control de pH en oxalamato de metilo

	control de pH	ee (16 h)	pH (40 h)	ee (40 h)	rendimiento	ee (prod-R)	E
A	pH stat 7.0	74%	6,6	100%	42%	-71%	48
B	ninguno	84%	5,5	100%	47%	-84%	68

20 Condiciones: oxalamato de 1-metil-3-fenilpiperazina metilo 10 mmol sólido, 25 ml de agua, 25 ml de MTBE, 50 mg de proteasa de *S. griseus* (al 2% en peso). Control del Exp. A de pH durante las primeras 24 h de reacción.

Tabla 10: Efecto del control de pH en oxalamato de etilo

	control de pH	pH inicial	ee (S)	ee (R)	E
A	ninguno	8,0	99,7	-92%	155
B	ninguno	5,9 (HOAc)	99,2	-91%	112
C	pH stat 7.0	8,1	99,3	-79%	45

Condiciones: oxalamato de etilo 1-metil-3-fenilpiperazina 10 mmol

oleoso, 50 ml de agua, 50 mg de proteasa de *S. griseus* (2% en peso). Exp C control de pH durante las primeras 24 h de la reacción.

- Se repitió una exploración del disolvente final usando las mejores condiciones conocidas a una concentración mucho mayor que la anterior.
- 5 Como ambos oxalamatos se habían solidificado se necesitó un codisolvente para ambos. Sorprendentemente, las condiciones óptimas otra vez no fueron idénticas (tabla 11).

Tabla 11: Exploración de disolvente final para los oxalamatos de (m)etilo

	Material de partida	Disolvente	T	pH	ee (todo S)
1	metilo	tolueno	21 h		99,3%
			24 h	5,3	99,85%
2	metilo	MTBE	21 h		94%
			24 h	5,5	48% (!)
3	metilo	ciclohexano	21 h		39%
			24 h	5,6	82%
4	etilo	tolueno	21 h		75%
			24 h	5,3	82%
5	etilo	MTBE	21 h		82%
			24 h	5,3	89%
6	etilo	ciclohexano	21 h		99,89%
			24 h	5,4	99,92%

- 10 Condiciones: 2,6 ó 2,8 g (10 mmol) de oxalamato de (m)etilo sólido, 10 ml de agua, 5 ml de disolvente, 50 mg (aprox. al 2% en peso) de proteasa de *S. griseus*. Se agitaron a Ta. Las exploraciones 2, 3 y 6 eran suspensiones. Después de 24 h, estas se homogeneizaron usando EtOAc, el pH se ajustó a 9 y se analizó usando GC quiral.

- 15 Como la selectividad para el oxalamato de etilo fue bastante más alta, el punto de fusión bastante bajo y la temperatura óptima descrita para la proteasa de *S. griseus* es bastante alta, se ensayó una única reacción a temperatura mayor para el oxalamato de etilo en bruto usando un codisolvente de ciclohexano.

- 20 A 50°C, fueron suficientes 16 h de reacción para que se completara la conversión hasta el 99,8% de ee usando sólo proteasa de *S. griseus* al 1% en peso. Estas condiciones se usaron para preparar la siguiente muestra a gran

escala.

#### Preparación de la muestra final de (S)-1-metil-3-fenilpiperazina

Una muestra de 170 g de oxalamato de etilo en bruto se redujo usando proteasa de *S. griseus* al 1% en peso en un recipiente de 1 l. El enantiómero R del éster oxalamato de etilo se hidrolizó selectivamente. Después de que la reacción se parara, se obtuvo el enantiómero S restante del éster oxalamato de 1-metil-3-fenilpiperazina etilo con un rendimiento en bruto del 47%. La hidrólisis del éster oxalamato de etilo mediante ebullición en un exceso de HCl al 15% dio la conversión completa para (S)-1-metil-3-fenilpiperazina en 1 h. Un tratamiento adicional produjo una cantidad bastante grande de un precipitado insoluble de composición desconocida. La extracción y la destilación en Kugelrohr del producto, produjo 42 g en forma de un sólido de color blanco (36% global; 99,8% de ee). La impureza inicial al 0,5% en el material de partida se aumentó al 1,5%.

Un aumento de magnitud mucho más pequeña usando el oxalamato de metilo recristalizado proporcionó una muestra más pura, mientras que el 0,5% de impureza en el material de partida no se concentró en el producto final.

#### Detalles experimentales adicionales

##### Materiales

20

Cloroxalato de metilo	Aldrich
Clorooxalato de etilo	Acros
Trifluoroanhídrido acético	Acros
Anhídrido acético	Merck
Cloruro de propionilo	Aldrich
Cloruro de butiroílo	Aldrich
Cloruro de benzoílo	Aldrich
Proteasa de <i>S. griseus</i>	Sigma
Disolvente	p.a.

##### Análisis

Las muestras se analizaron en una GC en columna quirasil-DEX CB (vehículo de helio, fracción 1:20). Programa de temperatura: 140°C durante 2 min; 5°C/min hasta 180°C; 180°C durante 10 min.

La piperazina no se pudo resolver sobre la GC. Se necesitó

derivatización con trifluoroacetamida para lograr una buena separación de los enantiómeros. Se disolvió una pequeña cantidad de piperazina (10-50 mg) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se trató con trietilamina y anhídrido trifluoroacético. Basificación después de la reacción usando carbonato sódico al 10%. La muestra se secó antes del análisis.

El análisis por TLC usando placas de sílice, mezclas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (habitualmente 90:10) en forma de eluyente y tanto fluorescencia UV como detección  $\text{I}_2$ .

Síntesis de racematos acilados

#### 10 Oxalamato de 1-metil-3-fenilpiperazina metilo

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (17,6 g; 0,1 mol) en diclorometano 100. Se añadió trietilamina (5 ml; aprox. 0,03 mol). Se añadió lentamente una solución de clorooxalato de metilo (10 ml; 0,10 mol) en diclorometano en refrigeración. Después de la adición total se formó una suspensión de color blanco. El análisis por TLC mostró que la conversión se había completado. La mezcla se inactivó con carbonato sódico al 10%. La capa orgánica se lavó de nuevo con carbonato, se secó y se evaporó para dar un aceite (25,5 g; 97%).

TLC: bastante puro, algunas impurezas polares menores. GC: posible separación quiral a los 15,7/16,0 min (contiene aprox. el 0,4% de impureza a los 3,8 min (presente en la piperazina de partida) que puede usarse como patrón interno).

El material solidifica en reposo. Intento de recristalización en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$ . Esto proporciona 20 g en forma de un sólido de color pardo claro (76%). P.f. 103-5°C.

25 GC: se elimina la impureza a los 3,8 min.

#### Oxalamato de etilo de 1-metil-3-fenilpiperazina

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (123,2 g; 0,70 mol) en diclorometano 500. Se añadió trietilamina (30 ml; aprox. 0,2 mol). Se añadió lentamente una solución de clorooxalato de etilo (107 g; 0,78 mol) en diclorometano en refrigeración. A 2/3 del total de la adición se formó una suspensión espesa. Incluso después de la adición de más disolvente, la agitación siguió siendo difícil. La mezcla se inactivó con carbonato sódico al 10%. La capa orgánica se lavó de nuevo con carbonato, se secó y se evaporó para dar un aceite de color naranja (191,2 g; 0,69 mol; 99%). La cristalización con siembra resultó difícil. Evaporación profunda y almacenamiento en forma de un aceite. TLC: muy

pura, una pequeña cantidad de material polar coloreado en la medida inicial. Sin trazas de la dioxamida (preparada a partir de cloruro de oxalilo y piperazina). GC: 18,0/18,2 min, 0,36% de área de impureza a los 3,8 min. Una muestra pequeña (20 g) se agitó con agua para provocar la cristalización, p.f. a  
5 aprox. 45°C. La mayoría del aceite solidificó después de pocos días de reposo. Antes del uso, fue necesaria la fusión.

#### Acetil 1-metil-3-fenilpiperazina

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (17,6 g; 0,1 mol) en diclorometano  
100. Se añadieron anhídrido acético y trietilamina. El tratamiento acuoso  
10 produjo >100% de aceite de mal olor (exceso de Ac<sub>2</sub>O). La destilación en Kugelrohr a 160°C/0,05 mbar produjo 20,6 g de aceite (94%). GC quiral: 10,3/10,6 min

#### Propionil 1-metil-3-fenilpiperazina

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (17,6 g; 0,1 mol) en diclorometano  
15 100. Se añadió trietilamina (15 ml; 0,1 mol). Se añadió lentamente una solución de cloruro de propionilo (10 g; 0,11 mol) en diclorometano en refrigeración. Después de la adición total se formó una suspensión de color blanco. La mezcla se inactivó con carbonato sódico al 10%. La capa orgánica se lavó de nuevo con carbonato, se secó y se evaporó para dar un aceite (23,34 g; 100%).  
20 La destilación en Kugelrohr a 187°C/0,05 mbar produjo 21,6 g de aceite (93%). GC quiral: 10,25/10,39 min

#### Butiril 1-metil-3-fenilpiperazina

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (17,6 g; 0,1 mol) en diclorometano  
100. Se añadió trietilamina (5 ml; 0,05 mol). Se añadió lentamente una solución  
25 de cloruro de butiroílo (11,6 g; 0,11 mol) en diclorometano en refrigeración. Después de la adición total se formó una suspensión de color blanco. La mezcla se inactivó con carbonato sódico al 10%. La capa orgánica se lavó de nuevo con carbonato, se secó y se evaporó para dar un aceite (24 g). La destilación en Kugelrohr de 22,5 g a >200°C/0,05 mbar produjo 22,0 g de aceite  
30 (95%). GC quiral: 12,87/12,98 min, solapamiento severo.

#### Benzoil 1-metil-3-fenilpiperazina

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (17,6 g; 0,1 mol) en diclorometano  
100. Se añadió trietilamina (15 ml; 0,1 mol). Se añadió lentamente una solución  
de cloruro de benzoílo (16 g; 0,114 mol) en diclorometano en frío. Después de  
35 la adición total se formó una suspensión de color blanco. La mezcla se inactivó

con carbonato sódico al 10%. La capa orgánica se lavó de nuevo con carbonato, se secó y se evaporó para dar un aceite (aprox. 30 g). Se purificó por filtración de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5). La evaporación de las fracciones apropiadas proporcionó 26,2 g en forma de un aceite (94%) GC quiral: Sin separación usando diversos métodos.

#### Trifluoroacetil 1-metil-3-fenilpiperazina

Se disolvió 1-metil-3-fenilpiperazina (1,8 g; 0,01 mol) en diclorometano 50. Se añadió trietilamina (1 ml; 0,07 mol). Se añadió trifluoroanhídrido acético puro (2 ml). La mezcla se inactivó con carbonato sódico al 10%. La capa orgánica se lavó de nuevo con carbonato, se secó y se evaporó para dar un aceite (2,5 g; 92%). TLC muy puro. GC quiral: 5,9/6,2 min.

#### Reacciones de exploración

Las reacciones de exploración se realizaron como se ha descrito en las notas al pie de las tablas. Se usaron recipientes de 5 ml para reacciones de 1-4 ml, viales de 30 ml para una mayor optimización de las reacciones. Las reacciones que terminaron demasiado ácidas se neutralizaron a pH >8 para permitir la extracción de la piperazina básica (-derivado).

#### Preparación de muestra de (S)-1-metil-3-fenilpiperazina

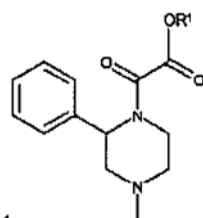
Se fundieron 170 g (0,62 mol) de oxalamato de etilo sólido y se transfirieron a un matraz de 1 l. Se añadieron 180 ml de ciclohexano y 700 ml de agua seguido de 1,7 g (al 1% en peso) de proteasa de *S. griseus*. Se agitaron a 50°C en una placa de calentamiento durante 23 h. La cromatografía de gases (GS) de la capa superior mostró >99,9% de ee. El pH de 5,22 se ajustó a pH 9 usando NaOH 1 M.

La mezcla de reacción se extrajo tres veces con acetato de etilo. Después del secado y la evaporación de la fase orgánica, se obtuvieron 80 g de aceite de color marrón (47%; E>160). Este éster (S)-oxalamato de etilo (+ de 4,7 g de producto de una anterior resolución de escala de 10 g) se hidrolizó a reflujo en 400 ml de HCl al 15% (aprox. 2 mol) durante 1 h. La hidrólisis se determinó para ser de aprox. 99,5% mediante GC. La mezcla de reacción se enfrió y el pH se ajustó a un valor de pH >11. La fase acuosa se extrajo con 3 x 250 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de la neutralización, se formó una gran cantidad de precipitado insoluble y se retiró por filtración. El extracto orgánico se secó y se evaporó para proporcionar 41 g de (S)-1-metil-3-fenilpiperazina en forma de un aceite. La extracción adicional de la fase acuosa usando acetato de etilo (100

ml), tolueno y éter produjo 6 g más de (S)-1-metil-3-fenilpiperazina (rendimiento global aproximadamente del 41%). Destilación a alto vacío en el Kugelrohr (140°C/0,05 mbar) produjo 41,8 g de aceite incoloro que cristalizó después de la siembra (238 mmol; 36% global). El residuo de destilación pesó 0,8 g. El punto de fusión del producto fue de 52°C y el ee resultó ser del 99,8%. La GC 5 mostró un aumento de impurezas presentes en el racemato de partida del 0,5% al 1,5%.

## REIVINDICACIONES

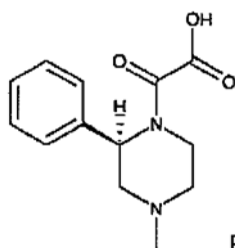
1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula 1,



Fórmula 1

- 5 en la que R<sup>1</sup> es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, bencilo o 2-haloetilo.

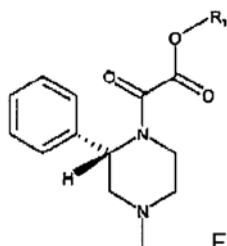
2. El derivado oxalámico de (*R*)-1-metil-3-fenilpiperazina de acuerdo con la fórmula 2.



Fórmula 2

10

3. El derivado oxalamato de (*S*)-1-metil-3-fenilpiperazina de acuerdo la con fórmula 3.



Fórmula 3

en la que R<sup>1</sup> es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, bencilo o 2-haloetilo.

15

4. Un método para preparar (*S*)-1-metil-3-fenilpiperazina por hidrólisis enzimática del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seguido de la separación y escisión del grupo éster oxalámico a partir del producto de reacción, en el que la proteasa de *Streptomyces griseus* se usa en forma de

una enzima para la hidrólisis enzimática.

5. Un método para preparar (*R*)-1-metil-3-fenilpiperazina por hidrólisis enzimática del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seguido de la separación y la escisión del grupo ácido oxalámico a partir de los productos de reacción, en el que la proteasa de *Streptomyces griseus* se usa como enzima para la hidrólisis enzimática.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, caracterizado por que la hidrólisis se realiza en un medio sin tampón.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, caracterizado por que la hidrólisis es de oxalato de 1-metil-3-fenilpiperazina metilo y el medio para la hidrólisis comprende tolueno o metil-*t*-butiléter.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, caracterizado por que la hidrólisis es de etiloxalato de 1-metil-3-fenilpiperazina y el medio comprende ciclohexano.