



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 504**

51 Int. Cl.:
C07D 207/12 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05757531 .8**
96 Fecha de presentación : **03.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1756052**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Método mejorado para la preparación de compuestos 3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina.**

30 Prioridad: **04.06.2004 NZ 533360**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **INDUSTRIAL RESEARCH LIMITED**
Gracefield Research Centre
69 Gracefield Road
Lower Hutt, NZ

72 Inventor/es: **Lenz, Dirk Henning;**
Mason, Jennifer Mary;
Clinch, Keith;
Evans, Gary Brian y
Tyler, Peter Charles

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 318 504 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

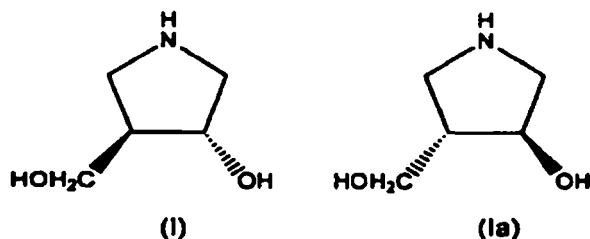
Método mejorado para la preparación de compuestos 3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para la preparación de compuestos de 3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina. Particularmente, la invención se refiere a un método para la preparación de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina o su enantiómero (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina. La invención también se refiere a la preparación de inhibidores de purina nucleósido fosforilasa (PNP) a partir de los citados compuestos.

10 **Estado de la técnica**

El compuesto conocido de fórmula (I), (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, es un intermedio clave para la síntesis de algunos de los inhibidores del solicitante, incluyendo los potentes inhibidores de PNP (ver ejemplo en PCT/NZ03/000186). El enantiómero del compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ia) y éste es también útil como intermedio en la síntesis de los inhibidores de PNP.



30

Makino y Ichikawa (K. Makino y Y. Ichikawa, *Tetrahedron Letters* (1998) 39, 8245) han descrito la síntesis del compuesto (I). Se introduce la necesaria quiralidad del compuesto utilizando la epoxidación asimétrica de Sharpless.

35

Karisson y Högberg (S. Karlsson y H.E. Högberg, *Tetrahedron: Asymmetry* (2001) 12, 1977) describen un método de síntesis alternativo. En dicho método, la quiralidad se introduce utilizando un auxiliar quiral de las sultamas.

Galeazzi y col. (R. Galeazzi, G. Martelli, G. Mobbili, M. Orena y S. Rinaldi, *Tetrahedron: Asymmetry* (2004) 15, 3249) prepararon el compuesto (I) mediante la adición de (*S*)-1-feniletilamina a un 2-sililoxi-3-metoxicarbonil-but-3-enoato de etilo.

40

Filichev y col. (V.V. Filichev y E.B. Pedersen, *Tetrahedron* (2001) 57, 9163; V.V. Filichev, M. Brandt y E.B. Pedersen, *Carbohydrate Research* (2001) 333, 115) han empleado materiales de partida quirales para obtener el compuesto (I). Por ejemplo, el compuesto (I) se puede preparar a partir de diacetona-D-glucosa o de D-xilosa. Sin embargo, los dos procedimientos de síntesis son complejos y requieren numerosos pasos de reacción.

45

Un método alternativo para introducir la quiralidad implica el empleo de catalizadores biológicos. Por ejemplo, Hansen y Bols (S.U. Hansen y M. Bols, *Acta Chimica Scandinavica* (1998) 52, 1214) abordaron la resolución enzimática del derivado N-Boc de trans-4-hidroximetilpirrolidin-3-ol racémico con lipasas inmovilizadas de *Candida antarctica* y *Mucor mihei*. Este método se centra en abordar la resolución del diol por medios enzimáticos. Sin embargo, se obtuvieron de esta forma escasos excesos enantioméricos, dando como resultado solo pequeñas cantidades del compuesto (I) que se dispuso para su uso como intermedio en la preparación de otros compuestos. Un rendimiento bajo de producto significa un desaprovechamiento considerable y por tanto un coste global alto.

55

Las síntesis publicadas del compuesto (I) se consideran insatisfactorias como rutas comercialmente viables para este valioso intermedio. Ha habido una necesidad continua para superar este problema desarrollando un método mejorado que utiliza solamente unos pocos pasos de reacción y con un rendimiento de producto total aceptable.

Se sabe que la resolución catalizada por lipasas de los ésteres *cis*- y *trans*- β -hidroxi carboxílico por *O*-acilación puede proporcionar compuestos enantiopuros con rendimientos altos (L.M. Levy, J.R. Dehl y V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* (2003) 14, 2053). Sin embargo, es muy difícil predecir la reactividad de una enzima a un posible sustrato. La especificidad de las enzimas es muy conocida en el estado de la técnica. Incluso cuando se comprueba que un compuesto determinado es un sustrato de enzima, hay a menudo poca seguridad en cuanto al rendimiento de la reacción y la pureza enantiomérica del producto.

65

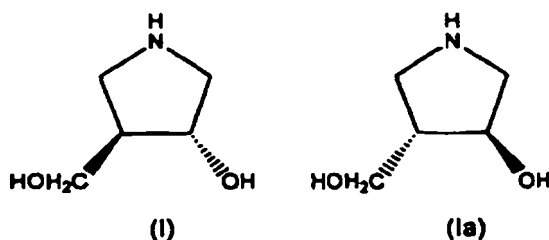
El solicitante ha comprobado que el compuesto (I) se puede preparar con un alto rendimiento y un elevado exceso enantiomérico a partir de un éster alquílico del ácido (\pm)-*trans*-4-hidroxipirrolidina-1-N-protégida-3-carboxílico, por medio de esterificación catalizada por lipasas (WO 2005/033076). Sin embargo, dicho método de preparación sufre de varias desventajas claves. En particular, el método requiere pasos de purificación cromatográfica. Tales pasos son pasos de procesamiento costosos. Añaden un coste considerable al método global y producen típicamente un rendimiento más bajo del compuesto. Estas desventajas son especialmente evidentes cuando el método se lleva a cabo a gran escala. Ha habido por lo tanto necesidad de un procedimiento mejorado para preparar los compuestos de fórmulas (I) y (Ia) que evite dichas desventajas, particularmente a escala del procedimiento requerido para producción comercial.

El solicitante ha desarrollado actualmente un método mejorado para preparar compuestos de 3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina utilizando materiales de partida fácilmente asequibles. Esta nueva ruta supera los problemas encontrados frecuentemente con las síntesis que emplean materiales de partida aquirales. Ello implica menos transformaciones químicas que los métodos publicados, y facilita la preparación de los compuestos deseados con un rendimiento y exceso enantiomérico altos. Sumamente importante es que el método mejorado evita la necesidad de pasos de purificación cromatográfica. Este sorprendente descubrimiento ofrece una ventaja sobre los procedimientos conocidos, incluyendo el procedimiento descrito en WO 2005/033076, que proporciona una ruta significativamente más simple y rentable para preparar los compuestos de 3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, y otros compuestos, tales como los inhibidores de PNP, que pueden prepararse a partir de los mismos.

Es por lo tanto un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para la preparación de compuestos de 3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina.

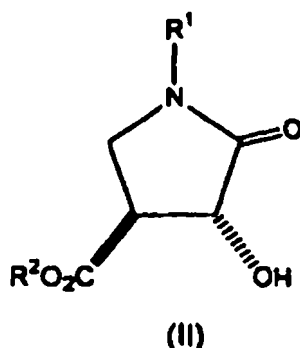
Resumen de la invención

En un primer aspecto la invención proporciona un procedimiento para la preparación de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, compuesto de fórmula (I), o (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, compuesto de fórmula (Ia):



incluyendo los pasos siguientes:

paso (a): hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas de un compuesto racémico de 3,4-*trans*-pirrolidino-na disustituida de fórmula (II):

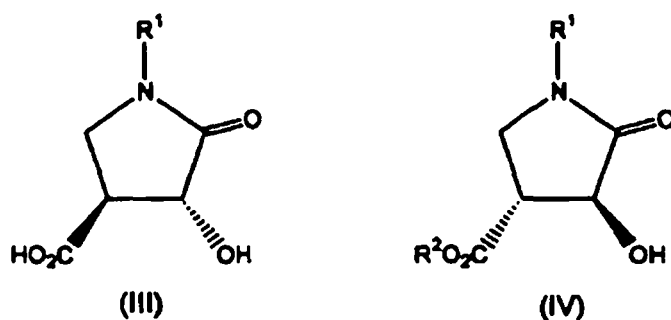


donde R¹ representa bencilo o benzhidrido, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente por halógeno, alquilo o alcoxi; y R² representa arilo o alquilo de cadena lineal o ramificada o aralquilo, cualquier de los cuales puede ser sustituido opcionalmente por halógeno, alquilo o alcoxi;

para dar o:

ES 2 318 504 T3

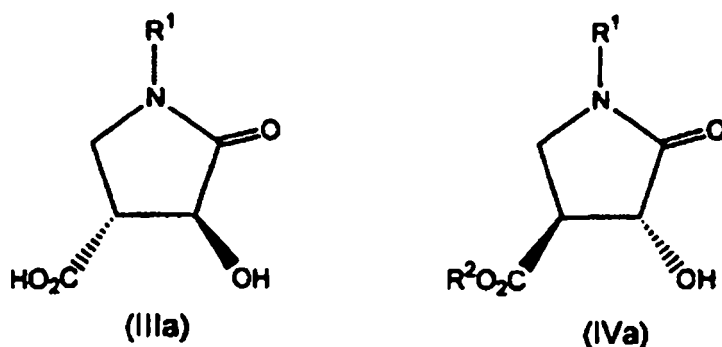
mezcla (i): un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituida de fórmula (III) y el compuesto de pirrolidinona sin reaccionar de fórmula (IV):



donde R^1 y R^2 son tal como se definen anteriormente;

o

mezcla (ii): un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituida de fórmula (IIIa) y el compuesto de pirrolidinona sin reaccionar de fórmula (IVa):



donde R^1 y R^2 son tal como se definen anteriormente;

donde la hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas se lleva a cabo utilizando una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (III), o una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (IIIa);

paso (b): separación del compuesto de fórmula (III) del compuesto de fórmula (IV) de la mezcla (i), o separación del compuesto de fórmula (IIIa) del compuesto de fórmula (IVa) de la mezcla (ii); y

paso (c): transformación del compuesto de fórmula (III) o el compuesto de fórmula (IVa) en el compuesto de fórmula (I), o transformación del compuesto de fórmula (IV) o el compuesto de fórmula (IIIa) en el compuesto de fórmula (Ia).

Se prefiere que la hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas del paso (a) se lleve a cabo utilizando una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (III).

Preferiblemente, cuando la hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas del paso (a) da una mezcla de los compuestos de fórmulas (III) y (IV), el exceso enantiomérico del compuesto (III) es de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%. Alternativamente, cuando la hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas del paso (a) da una mezcla de los compuestos de fórmulas (IIIa) y (IVa), el exceso enantiomérico del compuesto (IIIa) es de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%.

Se prefiere además que la enzima utilizada en la hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas en el paso (a) sea una lipasa o una esterasa. En una realización, la enzima es una lipasa, preferiblemente, de *Candida antarctica*. En otra realización, la enzima es una esterasa, preferiblemente, una esterasa de hígado de cerdo.

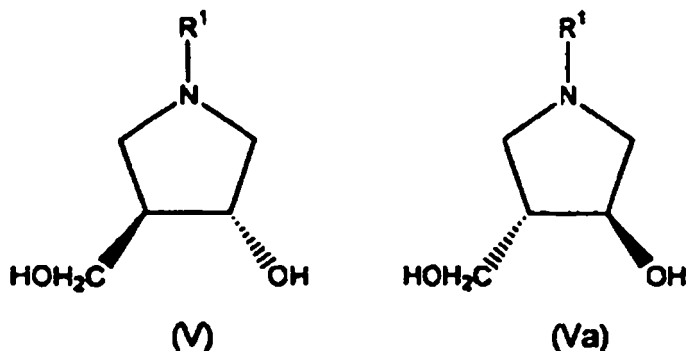
ES 2 318 504 T3

Se prefiere que cuando el compuesto de fórmula (III) se transforma en el compuesto de fórmula (I), la transformación se efectúa por medio de un procedimiento que incluye el paso de reducción del compuesto de fórmula (III) o fórmula (IIIa) para dar un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidina disustituida de fórmula (V) o fórmula (Va):

5

10

15



20

donde R^1 es tal como se define anteriormente.

25

Se prefiere que la reducción se lleve a cabo con hidruro de aluminio-litio o borano, más preferiblemente borano.

Preferiblemente la transformación incluye además el paso de la sustitución del grupo R^1 del compuesto de fórmula (V) o fórmula (Va) por hidrógeno para dar el compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia). Se prefiere que ello se lleve a cabo por hidrogenolisis.

30

También se prefiere que la separación del compuesto de fórmula (III) del compuesto de fórmula (IV) en el paso (b) se lleve a cabo por extracción del compuesto de fórmula (IV) de una solución acuosa que contiene el compuesto de fórmula (IV) y una forma de sal carboxilato del compuesto de fórmula (III) utilizando un primer disolvente inmiscible en agua, reduciendo luego el pH de la mezcla resultante para convertir la forma de sal carboxilato del compuesto de fórmula (III) en la forma de ácido carboxílico del compuesto de fórmula (III), y extrayendo luego la mezcla resultante de nuevo con un segundo disolvente inmiscible en agua.

35

Preferiblemente el disolvente inmiscible en agua es diclorometano o cloroformo, y el segundo disolvente inmiscible en agua es acetato de etilo.

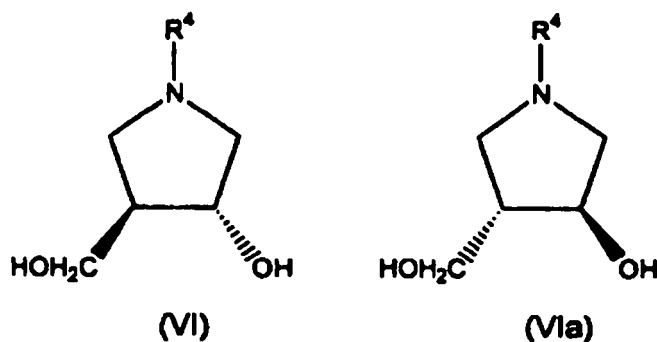
40

Opcionalmente, el compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia) se puede convertir en un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidina disustituida de fórmula (VI) o fórmula (VIa):

45

50

55



60

donde R^4 es un grupo N-protector.

Preferiblemente R^4 representa alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo o aralcoxycarbonilo. Más preferiblemente, R^4 representa *tert*-butoxicarbonilo, metoxicarbonilo o benciloxicarbonilo.

65

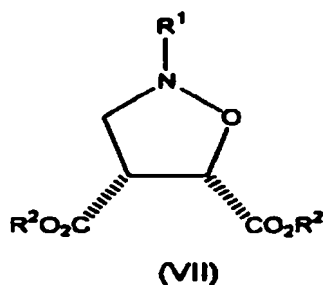
Donde R^4 es alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo o aralcoxycarbonilo, se prefiere que el compuesto de fórmula (I) se convierta en el compuesto de fórmula (VI) por tratamiento del compuesto de fórmula (I) con un agente alcoxicarbonilante, un agente ariloxicarbonilante o un agente aralcoxycarbonilante en presencia o ausencia de una base tal como trietilamina o hidróxido sódico.

ES 2 318 504 T3

Se prefiere además que el compuesto de fórmula (II) se prepare por medio de un procedimiento que incluye el paso de eliminación reductora del enlace N-O de un compuesto de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (VII), y ciclación *in situ* para dar el compuesto de fórmula (II):

5

10



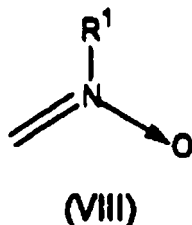
15

donde R¹ y R² son tal como se definen anteriormente.

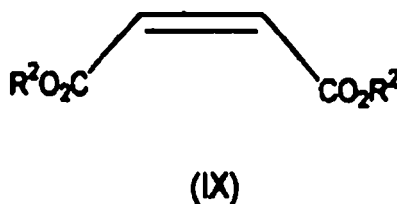
20

Más preferentemente, el compuesto de fórmula (VII) se prepara por 1,3-cicloadición de una nitrona de fórmula (VIII) y un alqueno de fórmula (IX):

25



30



35

donde R¹ y R² son tal como se definen anteriormente.

Preferiblemente, la 1,3-cicloadición se lleva a cabo generando la nitrona de fórmula (VIII) y después dejándola reaccionar *in situ* con el alqueno de fórmula (IX). Donde R¹ es bencilo, se prefiere que la nitrona de fórmula (VIII) sea generada por reacción de N-bencilhidroxilamina y HCHO.

40

Se prefiere que R¹ sea bencilo. Se prefiere además que R² sea alquilo. Más preferiblemente, R² es metilo o etilo.

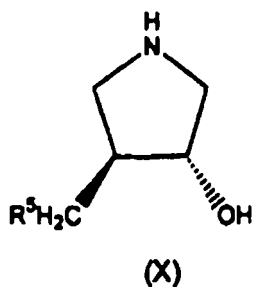
45

También se prefiere que la eliminación reductora y la ciclación *in situ* se lleve a cabo por hidrogenolisis o empleando Zn en presencia de un ácido.

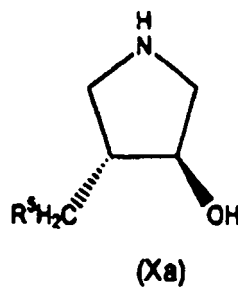
Se prefiere que el procedimiento de la invención incluya además la conversión del compuesto de fórmula (I) o (Ia) en un compuesto de fórmula (X) o (Xa):

50

55



60



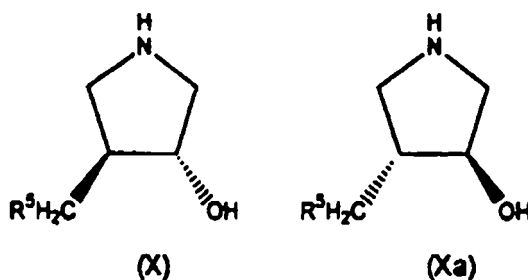
65

donde R⁵ se selecciona entre H, OH y SH, o de aquiloxi, aralquiloxi, ariloxi, alquiltio, aralquiltio y ariltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi.

ES 2 318 504 T3

En una realización preferida, el procedimiento de la invención también incluye la conversión del compuesto de fórmula (I) o (Ia) en un compuesto de fórmula (X) o (Xa) y la reacción del compuesto de fórmula (X) o (Xa) con un compuesto de fórmula (XI) para dar un compuesto de fórmula (XII) o (XIIa):

5

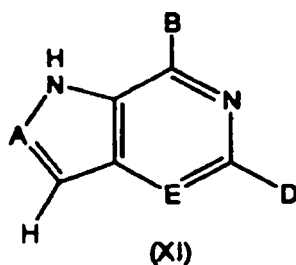


10

15

20

25

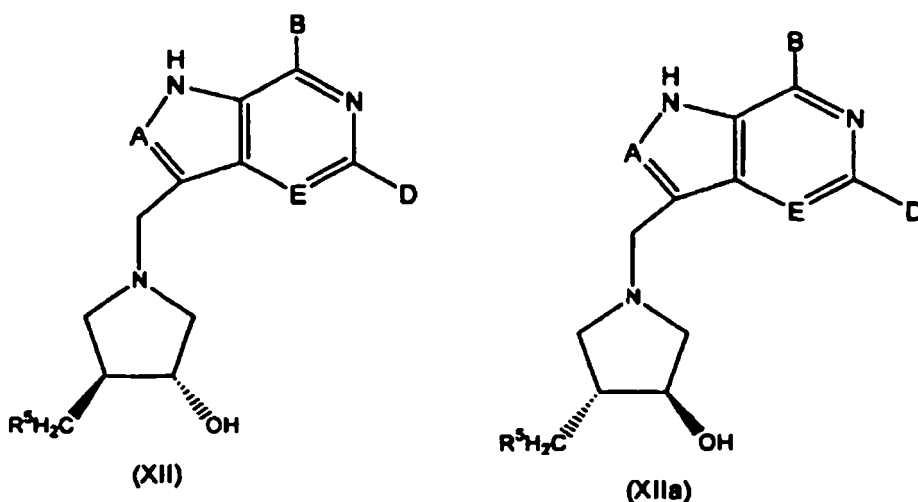


30

35

40

45



50 donde R^5 es tal como se define anteriormente.

55

A se selecciona entre N, CH y CR^6 , donde R^6 se selecciona entre halógeno, OH y NH_2 , o R^8 se selecciona entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi, o R^6 se selecciona entre NHR^7 , NR^7R^8 y SR^9 , donde R^7 , R^8 y R^9 se seleccionan entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi;

60

B se selecciona entre OH, NH_2 , NHR^{10} , SH, hidrógeno y halógeno, donde R^{10} se selecciona entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi;

65

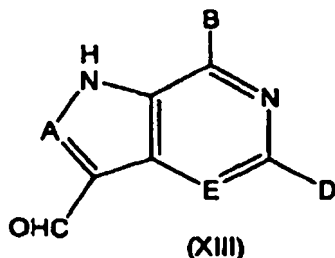
D se selecciona entre OH, NH_2 , NHR^{11} , hidrógeno, halógeno y SCH_3 , donde R^{11} se selecciona entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi; y

E se selecciona entre N y CH.

ES 2 318 504 T3

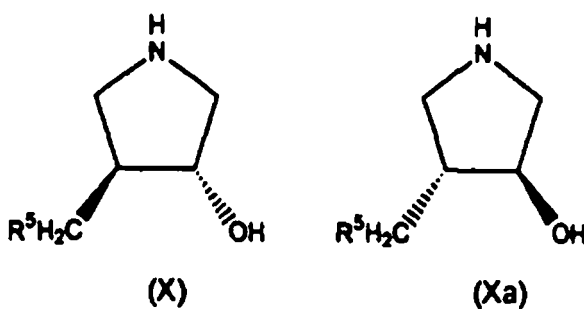
Preferiblemente la reacción se lleva a cabo con formaldehído o un equivalente de formaldehído.

En una realización alternativa, el compuesto de fórmula (XI) se convierte en un compuesto de fórmula (XIII) y después se hace reaccionar el compuesto de fórmula (X) o (Xa) con un compuesto de fórmula (XIII) para dar el compuesto de fórmula (XII) o (XIIa):



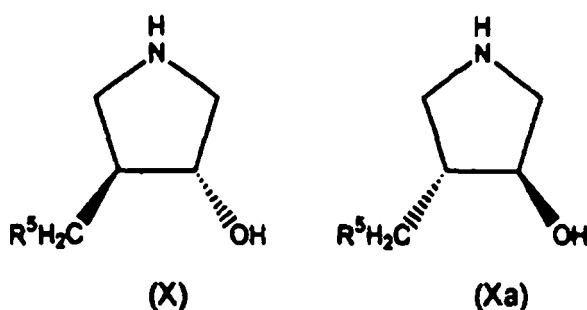
donde A, B, D y E son tal como se definen anteriormente, cada uno de los cuales y NH en el anillo de 5 miembros se pueden proteger con grupos protectores adecuados.

Preferiblemente el procedimiento de la invención incluye además la preparación del compuesto de fórmula (II) y además la conversión del compuesto de fórmula (I) o (Ia) en un compuesto de fórmula (X) o (Xa):

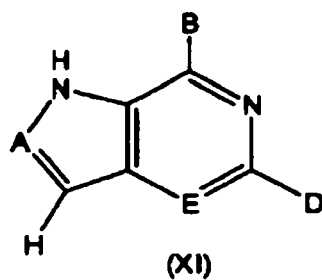


donde R⁵ se selecciona entre H, OH y SH, o entre alquiloxi, aralquiloxi, ariloxi, alquiltio, y alriltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi.

Preferiblemente el procedimiento incluye además la reacción del compuesto de fórmula (X) o (Xa) con un compuesto de fórmula (XI) para dar un compuesto de fórmula (XII) o (XIIa):

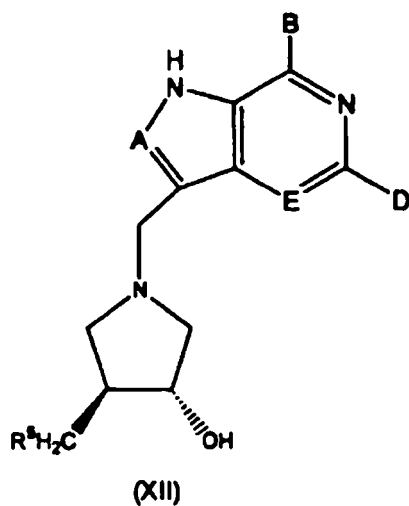


5



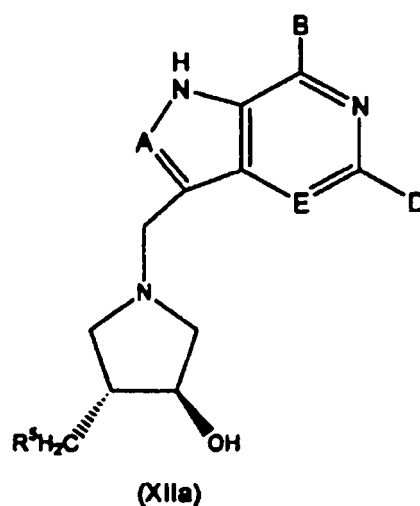
10

15



25

30

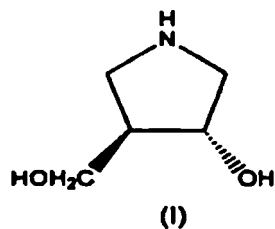


donde R^5 , A, B, D y E son tal como se definen anteriormente.

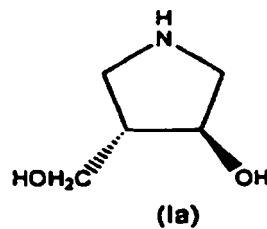
35

En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina, compuesto de fórmula (I) o (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina, compuesto de fórmula (Ia):

40



45

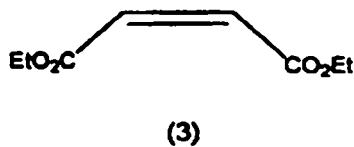
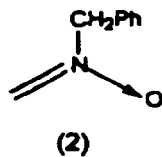


que incluye los pasos de:

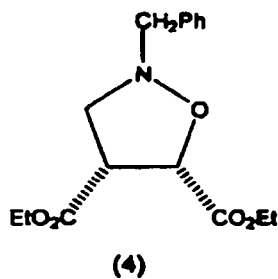
50

- (i) 1,3-cicloadición de una nitrona de fórmula (2) y un alqueno de fórmula (3) para dar un compuesto de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (4):

55



60

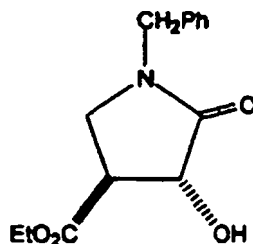


65

- (ii) eliminación reductora del enlace N-O del compuesto de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (4) y ciclación *in situ* para dar el compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidina disustituida de fórmula (5):

5

10



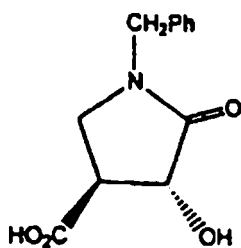
(5)

15

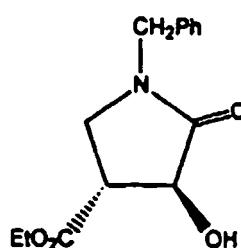
- (iii) hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas del compuesto de fórmula (5) para dar una mezcla de un compuesto de fórmula (6) y el compuesto sin reaccionar de fórmula (5), o una mezcla de un compuesto de fórmula (6a) y el compuesto sin reaccionar de fórmula (5a):

20

25



(6)

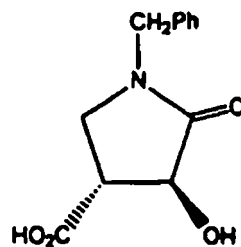


(5)

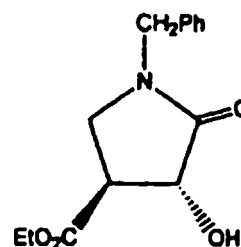
30

35

40



(6a)



(5a)

45

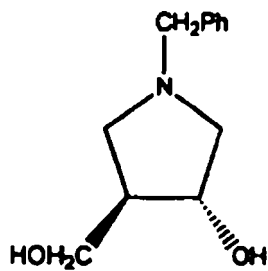
- (iv) separación del compuesto de fórmula (6) del compuesto de fórmula (5), o separación del compuesto de fórmula (6a) del compuesto de fórmula (5a):

50

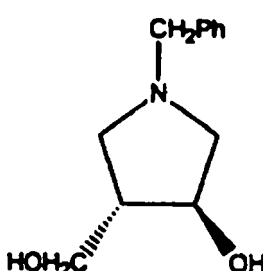
- (v) reducción del compuesto de fórmula (6) o (5a) para dar un compuesto de fórmula (7), o reducción del compuesto de fórmula (6a) o (5) para dar un compuesto de fórmula (7a):

55

60



(7)



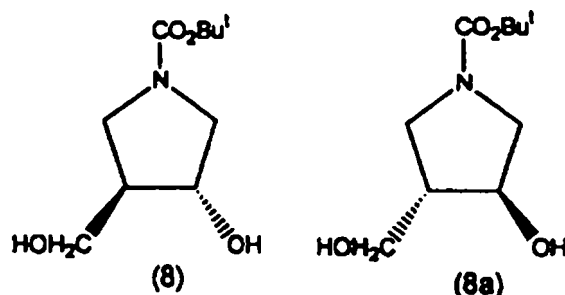
(7a)

65

- (vi) sustitución del grupo CH₂Ph por hidrógeno en el compuesto de fórmula (7) para dar el compuesto de fórmula (I), o sustitución del grupo CH₂Ph por hidrógeno en el compuesto de fórmula (7a) para dar el compuesto de fórmula (Ia).

En otra realización, el procedimiento incluye el paso de:

- (vii) conversión del compuesto de fórmula (I) en un compuesto de fórmula (8), o conversión del compuesto de fórmula (Ia) en un compuesto de fórmula (8a):



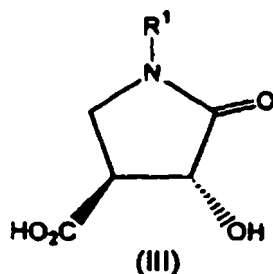
por tratamiento del compuesto de fórmula (I), o el compuesto de fórmula (Ia) con di-*tert*-butildicarbonato o di-*tert*-butildicarbonato.

El compuesto de fórmula (I), o el compuesto de fórmula (Ia), opcionalmente no se aíslan, y la conversión del compuesto de fórmula (I) en el compuesto de fórmula (8), o el compuesto de fórmula (Ia) en el compuesto de fórmula (8a), en el paso (vii) se efectúa *in situ*.

La invención también proporciona (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, cuando se prepara por el procedimiento de la invención, y (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, cuando se prepara por el procedimiento de la invención.

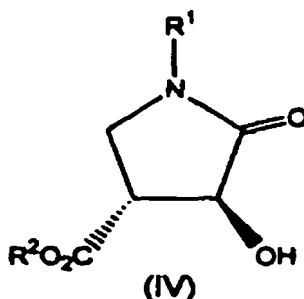
La invención proporciona además un compuesto de fórmula (XII), cuando se prepara por el procedimiento de la invención, y un compuesto de fórmula (XIIa), cuando se prepara por el procedimiento de la invención.

La invención proporciona además un compuesto de fórmula (III):



donde R¹ es tal como se define anteriormente.

La invención también proporciona un compuesto de fórmula (IV):



donde R¹ y R² son tal como se definen anteriormente.

Descripción detallada

La invención proporciona una ruta práctica para preparar (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina así como su enantiómero (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, los cuales son útiles para la síntesis de potentes inhibidores de enzimas.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, la quiralidad se introduce convenientemente utilizando un catalizador biológico, y no se requiere purificación cromatográfica en el paso de la resolución. El procedimiento proporciona ventajosamente una ruta eficaz para los compuestos de fórmula (III), los cuales son intermedios para la preparación de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina. También proporciona una ruta para los compuestos de fórmula (IIIa), los cuales son intermedios para la preparación de (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina. Otra ventaja de este procedimiento es que proporciona fácilmente una ruta para los compuestos de fórmulas (IV) y (IVa). Los compuestos de fórmulas (IV) y (IVa) pueden aprovecharse en otras aplicaciones.

Ventajosamente, los compuestos (III) y (IV) se obtienen con altos rendimientos y excelente enantioselectividad, y se separan fácilmente.

Una ventaja adicional del procedimiento es que, dependiendo de la selección de la enzima, el procedimiento puede también proporcionar una ruta para el compuesto (IVa), el cual se puede también separar fácilmente del compuesto de fórmula (IIIa) y transformarse en el compuesto deseado, (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina.

Será evidente para los expertos en la materia que las mezclas racémicas de los compuestos de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (VII) y de los compuestos de 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituida de fórmula (II) se obtienen de acuerdo con la invención. Ventajosamente, los materiales de partida fácilmente asequibles pueden utilizarse para producir inicialmente los compuestos de fórmula (II) en dos pasos solamente, y con un alto rendimiento. La subsiguiente hidrólisis enantioselectiva de un compuesto de fórmula (II) proporciona formas enantioméricas puras, o al menos mezclas altamente enriquecidas en un enantiómero.

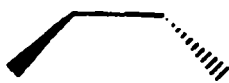
También será evidente para los expertos en la materia que los grupos R¹ y R², tal como se definen anteriormente, pueden ser opcionalmente sustituidos. Por ejemplo, R² puede ser sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halógeno y alquilo de cadena lineal o ramificada o alcoxi. De la misma manera, R¹ puede ser sustituido con halógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada o alcoxi, por ejemplo, p-metoxi.

Se entenderá que las representaciones de cualquier de los compuestos que tienen sustituyentes B y D, y donde B y/o D es un grupo hidroxilo, son la forma tautomérica de tipo enol de la correspondiente amida, y existirán mayoritariamente en forma de amida. El uso de la representación tautomérica de tipo enol es simplemente para hacer que menos fórmulas estructurales representen los compuestos de la invención.

Asimismo, se entenderá que las representaciones de cualquier de los compuestos que tienen sustituyentes B y D, y donde B y/o D es un grupo tiol, son la forma tautomérica de tipo tioenol de la correspondiente amida, y existirán mayoritariamente en forma de tioamida. El uso de la representación tautomérica de tipo tioenol es simplemente para hacer que menos fórmulas estructurales representen los compuestos de la invención.

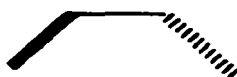
Aunque se prefiere que el compuesto de fórmula (VI) incorpore un grupo N-protector de *tert*-butoxicarbonilo, será evidente para el experto en la materia que se pueden emplear otros grupos N-protectores (ver por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis" por Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, Wiley-Interscience, 3rd edition (May 15, 1999)). Otros grupos protectores adecuados incluyen derivados de alcóxicarbonilo, arilcarbonilo, aralcoxicarbonilo, acilo o sulfonilo.

Tal como aquí se utiliza, las fórmulas estructurales que muestran la notación en forma de "cuña", p.ej.:



están destinadas a representar las formas enantioméricas puras de un isómero *trans*.

Asimismo, las fórmulas estructurales que muestran la notación en forma "rectangular", p.ej.:



están destinadas a representar las mezclas racémicas de los isómeros *trans*.

60 Síntesis de los Compuestos

En una realización preferida de la invención (Esquema 1), el compuesto (+)-8 se prepara a partir de maleato de dietilo 3 y nitrona 2. Los pasos de cicloadiación secuencial, eliminación reductora y redistribución mostrados en el Esquema 1 proporcionan eficientemente la *trans*-pirrolidina sustituida (±)-5, la cual se ha obtenido previamente solo por cristalización fraccional de una mezcla *cis-trans* (Kametani, T., Kigawa, Y., Ihara, M. Tetrahedron, 1979, 35, 313-316).

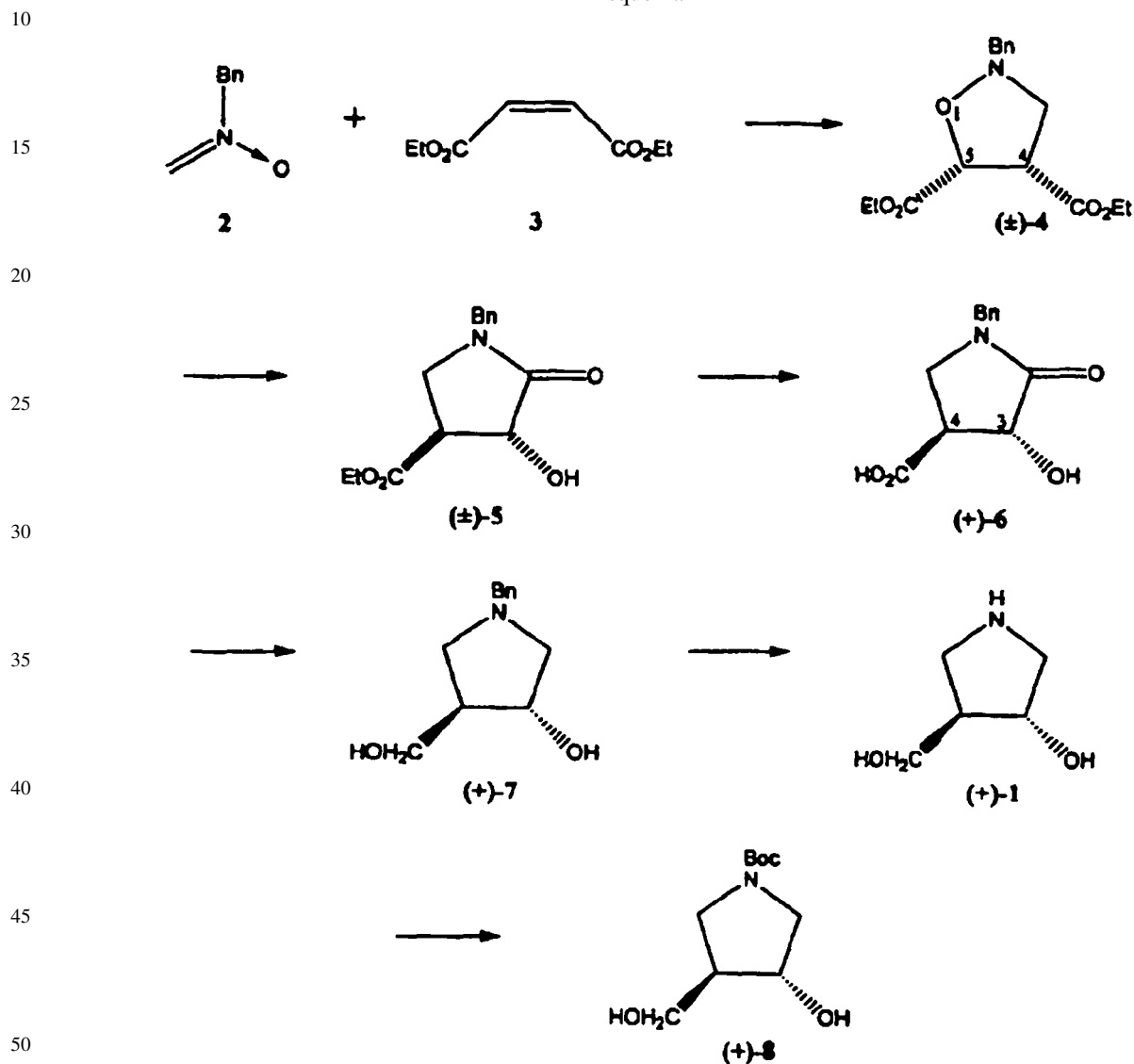
La reacción de 1,3-cicloadiación de nitronas, tal como 2, con alquenos, que conduce a las isoxazolidinas, es una reacción conocida para los expertos en la técnica. Dicha cicloadiación ocurre en una forma específicamente *cis* para

ES 2 318 504 T3

que la estereoquímica relativa en C-4 y C-5 de la isoxazolidina esté siempre controlada por la relación geométrica de los sustituyentes del alqueno.

La eliminación reductora del enlace N-O de las isoxazolidinas, muy comúnmente por hidrogenólisis o con zinc y ácido, da los β -amino alcoholes. Los amino alcoholes obtenidos de las 5-alcóxicarbonil isoxazolidinas se ciclizan fácilmente en pirrolidinonas, sin ninguna epimerización en C-4 o C-5 (numeración de las isoxazolidinas). De este modo, una 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituída da origen a una 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituída.

Esquema 1



Los productos (±)-4 y (±)-5 del esquema anterior son mezclas racémicas. El empleo de hidrólisis enantioselectiva proporciona formas enantioméricas puras, o el menos mezclas altamente enriquecidas en un enantiómero [(±)-6, (±)-7, (±)-1, (±)-8]. Por consiguiente, este procedimiento es adecuado para su uso en la obtención de productos farmacéuticos.

Las lipasas se utilizan comúnmente para las hidrólisis estereoselectiva y enantioselectiva de los ésteres (Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 2004, 94-119). Se ha demostrado recientemente que la lipasa B de la levadura *Candida antarctica* (CALB) es una enzima particularmente eficiente y robusta, catalizando un gran número de reacciones enantioselectivas (Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 2004, 94-119; Anderson, E.M., Larson, K.M.; Kira, O. *Biocatalysis Biotransformation*, 1997, 16, 181-204).

Las formas inmovilizadas de CALB, tales como el preparado comercial Novozyme® 435, poseen una elevada estabilidad y se separan fácilmente de los productos de reacción (Anderson, E.M., Larson, K.M.; Kira, O. *Biocatalysis Biotransformation*, 1997, 16, 181-204).

El procedimiento de la invención utiliza preferiblemente Novozyme® 435 para la resolución del éster racémico (\pm)-5. La hidrólisis enantioselectiva da el ácido (\pm)-(3*R*,4*S*)-6 con un buen rendimiento (36-45% basado en el racemato) y un excelente exceso enantiomérico (94-96%), conjuntamente con el éster (-)-5 (ee > 97%).

La reducción del ácido carboxílico y los fragmentos lactama se consigue comúnmente con hidruro de aluminio-litio o borano (Barrett, A.G.M., en *Comprehensive Organic Synthesis* (Ed. Trost, B.M. y Fleming, I), Pergamon, Oxford, 1991, 8, 237-238 y 249-251).

El solicitante ha descubierto que la obtención *in situ* de borano a partir de borohidruro de sodio utilizando el complejo boro trifluoruro-éter dietílico es un método práctico para la reducción de (+)-6 para dar la *N*-bencilpirrolidina (+)-7, la cual se convierte después en (+)-1 por hidrogenolisis. Se puede formar el correspondiente Boc-carbamato (+)-8 por medio de varios métodos conocidos por los expertos en la técnica. En la realización preferida de la invención, di-*tert*-butil-dicarbonato y una base tal como el hidróxido sódico o trietilamina en metanol se utilizan en este paso.

Ventajosamente, el nuevo procedimiento para la síntesis de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina incluye menos transformaciones químicas que los métodos previamente conocidos. Los compuestos deseados se obtienen con altos rendimientos. Además, el procedimiento evita o disminuye el empleo de purificación cromatográfica, lo cual es problemático cuando se requieren cantidades mayores (p.ej., kilogramos), haciendo que el procedimiento sea sumamente adecuado a gran escala en la preparación de grandes cantidades de compuestos para uso farmacéutico.

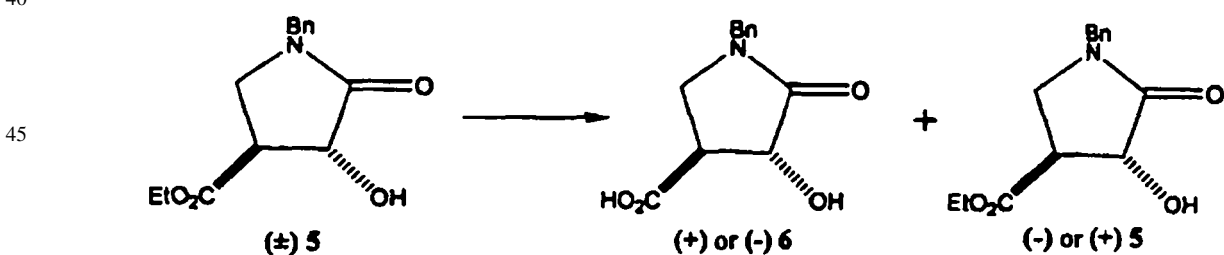
Una ventaja adicional del presente procedimiento es que la *N*-bencilpirrolidina (+)-7 puede ser cristalizada, mejorando así el exceso enantiomérico. Además, el compuesto (+)-1 puede ser fácilmente convertido en un material cristalino, el derivado *N-tert*-butoxicarbonilo (+)-8. El compuesto (+)-8 es un intermedio muy estable y se reconvierte convenientemente en (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina (+)-1 por simple tratamiento ácido.

Opcionalmente, se pueden incluir los pasos de recristalización para aumentar la pureza enantiomérica de los compuestos deseados.

Los procedimientos para el uso de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) como intermedios para la preparación de los inhibidores de PNP se describen en detalle en los documentos WO 2004/018496 (PCT/NZ2004/000186) y WO 2004/069856 (PCT/N22004/000017).

Cribado de hidrolasas

La metodología de cribado expuesta más abajo permite determinar si alguna enzima será efectiva para la resolución enzimática de esta invención. Se ha de entender por lo tanto que la invención no está limitada a ninguna enzima específica descrita o reivindicada. La metodología permite seleccionar cualquier enzima de un grupo, cribar la enzima para obtener el rendimiento y exceso enantiomérico deseados y utilizar dicha enzima en el procedimiento de la invención o seleccionar una enzima alternativa.



Se ha ensayado un total de veintidós lipasas, esterases y proteasas (Tabla 1) para valorar su capacidad de catalizar la hidrólisis representada en el Esquema 1. Cada enzima (5-50 mg, Tabla 1) se agitó con el éster racémico (\pm)-5 (50 mg), *tert*-butil metil éter (MTBE, 0,1 mL), tampón fosfato (0,1 M, pH 7,5, 0,1 mL), agua (1 mL) y el indicador rojo fenol. Mientras la hidrólisis proseguía, el producto ácido (6) se valoró con hidróxido sódico (0,1 M) hasta viraje del rojo fenol. De ese modo, el consumo de hidróxido sódico es una medida del alcance de la reacción. Quince de las enzimas no pudieron lograr una conversión del 10% durante 24 h por lo que fueron descartadas. Las siete reacciones restantes se sometieron a un proceso extractivo, tanto cuando se hubo alcanzado la conversión del 50% [esterasa de hígado de cerdo (PLE), subtilisina, Novozyme 435] como cuando no se observó ninguna conversión (pancreatina, lipoproteína lipasa de *Pseudomonas* sp., lipoproteína lipasa de *Chromobacterium viscosum*, Lipozyme). Los extractos que contenían tanto el éster 5 como el ácido 6 fueron tratados con trimetilsilildiazometano a fin de convertir el ácido en el correspondiente metil éster. A continuación la pureza enantiomérica de 5 y 6 pudo ser entonces determinada por HPLC (Chiracel OD-H). La esterasa de hígado de cerdo, Novozyme 435 y pancreatina rindieron 5 y 6 con excesos enantioméricos de moderados a altos (Tabla 1), si bien la pancreatina solo reaccionó muy lentamente a cargas enzimáticas altas. Las dos primeras de estas enzimas se seleccionaron por tanto para un nuevo estudio. Cada una de ellas hidroliza preferentemente un enantiómero diferente del éster 5. La Novozyme 435 da el ácido 6 (+) y el éster 5 (-) mientras que la PLE da 6 (-) y 5 (+).

ES 2 318 504 T3

TABLA 1

Cribado de enzimas para valorar su utilidad como catalizadores de la hidrólisis enantioselectiva del éster racémico 6

	Enzima	Cantidad (mg, µL)	Tiempo (h)	Alcance de la reacción (%)	E.E. del éster	E.E. del ácido	Enantiómero convertido	
5								
10	Esterasas	Esterasa de hígado de cerdo (PLE)	20	0,25	51	77,9	72,9	(-)
15	Proteasas	Papaína	50	22	< 10	n.d.	n.d.	
		Subtilisina	12	0,8	48	11,3	18,3	(+)
20	Lipasas	Novozyme 435	5	6	51	85,3	71,1	(+)
		Pancreatina	49	31,6	39	92,0	79,1	(-)
		Lipoproteína lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp.	17	10,5	45	44,0	45,4	(-)
25		Lipoproteína lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	14	48	36	40,6	61,4	(-)
		Lipozyme	49	30	38	0,6	24,3	(+)
30		Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> , inmovilizada en Sol-Gel	46	28	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Aspergillus Niger</i> , inmovilizada en Sol-Gel	48	28	< 10	n.d.	n.d.	
35		Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> , inmovilizada en partículas cerámicas	49	28	< 10	n.d.	n.d.	
40		Novozyme 871	50	23	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Rhizopus arrhizus</i>	50	23	< 10	n.d.	n.d.	
45		Lipasa de <i>Candida lipolytica</i>	37	23	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Mucor javanicus</i>	38	23	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Penicillium roqueforti</i>	33	23	< 10	n.d.	n.d.	
50		Lipasa de germen de trigo	31	23	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	32	23	< 10	n.d.	n.d.	
55		Lipasa de <i>Rhizimucor miehei</i>	21	23	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19	23	< 10	n.d.	n.d.	
60		Lipoproteína lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. 2	1	48	< 10	n.d.	n.d.	
		Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	25	24	< 10	n.d.	n.d.	

65 La PLE catalizó la hidrólisis de 5 en presencia de varios codisolventes. El exceso enantiomérico del éster y ácido recuperado fue en gran parte independiente del codisolvente (Tabla 2). Si se dejaba que la reacción de hidrólisis prosiguiera hasta completar el 70%, se obtenía el éster (+)-5 sin reaccionar con un excelente exceso enantiomérico (Tabla 3), pero con una reducción concomitante en el rendimiento.

TABLA 2

Hidrólisis con PLE empleando diferentes codisolventes

Codisolvente*	Masa PLE (mg)	Tiempo (min)	Alcance de la reacción (%)	E.E. del éster (%)	E.E. del ácido (%)
MTBE	4,4	80	49	76,2	n.d.
Acetona	4,4	105	52	77,3	64,8
Tolueno	4,6	70	53	75,7	56,8
Diclorometano	4,8	40	52	80,4	68,7

TABLA 3

Hidrólisis con PLE hasta completar más del 50%

Codisolvente*	Masa PLE m(mg)	Alcance de la reacción (%)	E.E. del éster (%)
Acetona	4,4	52	77,3
Tolueno	4,6	53	75,7
Acetona	4,8	59	83,7
Tolueno	4,7	60	88,0
Acetona	4,6	71	92,5
Tolueno	4,6	70	94,5

*** Las reacciones se llevaron a cabo tal como se describe en el apartado "Cribado de Hidrolasas" con la excepción de que las reacciones se dejaron que prosiguieran hasta completar más del 50%.**

La Novozyme 435 resolvió el compuesto (\pm)-5 en el ácido (+)-6 y el éster (-)-5, cada uno de ellos con un buen e.e. (-95%), y ambos sin ningún codisolvente y en presencia de acetona. El éster 5 se redujo con el complejo borano-dimetilsulfuro a la *N*-bencil-pirrolidina 7 con un rendimiento moderado.

Ejemplos

La invención se describe además en base a los siguientes ejemplos. Se entenderá que la invención no queda limitada a dichos ejemplos.

Ejemplo 1

Ester dietílico del ácido (\pm)-2-N-bencil-isoxazotidina-4,5-cis-dicarboxílico [(\pm)-4]

N-bencilhidroxilamina clorhidrato (144,8 g, 0,91 mol) y acetato de sodio anhidro (82 g, 1 mol) se agitaron juntos en etanol (800 mL) a temperatura ambiente durante un periodo de 30 minutos después del cual se añadió una solución acuosa de formaldehído al 37% (134 mL, 1,8 mol) y se continuó la agitación durante 1 hora. Se añadió maleato de dietilo (134 mL, 0,83 mol) y la mezcla se agitó durante 1 h seguido de calentamiento a reflujo durante 2 h. Después

ES 2 318 504 T3

de enfriamiento, la mezcla se filtró, el filtrado se evaporó y el residuo fue recogido en acetato de etilo (1,5 L) y lavado tres veces con bicarbonato sódico saturado (200 mL cada vez). La fase orgánica se extrajo y se secó (MgSO₄) y el disolvente se evaporó para dar el producto crudo (±)-4 en forma de aceite amarillo (250,3 g, 98% en base a la cantidad de maleato de dietilo). Se purificó una pequeña cantidad por cromatografía en columna de sílice (eluyente: EtOAc:hexanos, 2:8 v/v). Datos analíticos: ¹H-RMN (CDCl₃) δ ppm: 7,40-7,20 (m, 5H), 4,76 (br. D, 1H), 4,29-4,08 (m, 5H), 4,02 (br. D, 1H), 3,77 (q, 1H, J = 8,7 Hz), 3,60-3,00 (br. M, 2H), 1,28 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 1,25 (t, 3H, J = 7,2 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ ppm: 169,1 (s), 136,4 (s), 129,0 (d), 128,4 (d), 127,6 (d), 77,0 (d), 62,5 (t), 61,4 (t), 61,3 (t), 56,8 (br. t), 50,4 (br. d), 14,0 (q). EIMS (+ve): m/z Calculado para C₁₆H₂₁NO₅ (M)⁺ 307,14197; Encontrado: 307,14184.

10

Ejemplo 2

Ester etílico del ácido (±)-trans-1-N-bencil-3-hidroxi-2-pirrolidinona-4-carboxílico [(±)-5]

15

A un a solución del producto crudo éster dietílico del ácido 2-N-bencil-isoxazolidina-4,5-cis-dicarboxílico (±)-4 (250,3 g, 0,81 mol) en ácido acético (2 L) se añadió zinc en polvo en una porción (106 g, 1,62 mol). Se utilizó un baño de hielo-agua durante unos pocos minutos para controlar la exoterma muy leve. La mezcla se agitó durante 15 minutos y luego se filtró a través de Celite. El disolvente se evaporó, el residuo se recogió en diclorometano (1,5 L) y se lavó con porciones de 300 mL de solución saturada de bicarbonato sódico hasta que no se observó más desgasificación. Se extrajo la fase orgánica y se secó (MgSO₄) y el disolvente se evaporó para dar el producto crudo (±)-5 en forma de aceite marrón claro (193,6 g, 91%). Se purificó una pequeña cantidad por cromatografía en columna de sílice (eluyente: acetato de etilo:hexanos, 1:1 v/v). Datos analíticos: Punto de fusión 65-66°C (acetato de etilo-hexanos), Lit. 62-63,5°C. ¹H-RMN (COCl₂) δ ppm: 7,38-7,19 (m, 5H), 4,67 (dd, 1H, J = 8,3, 3,4 Hz, pasó a d, J = 8,5 Hz en el intercambio en D₂O), 4,62 (d, 1H, J = 3,5 Hz, desapareció en el intercambio en D₂O), 4,53 (d, J = 14,6 Hz, A del sistema AB), 4,42 (d, 1H, J = 14,7 Hz, B del sistema AB), 4,19 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 3,44 (t, 1H, J = 9,6 Hz), 3,34 (t, 1H, J = 9,2 Hz), 3,14 (q, 1H, J = 8,8 Hz), 1,26 (t, 3H, J = 7,1 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ ppm: 172,9 (s), 171,4 (s), 135,1 (s), 128,9 (d), 128,2 (d), 128,0 (d), 72,3 (d), 61,5 (t), 47,0 (t), 46,1 (d), 45,1 (t), 14,1 (q). EIMS: m/z Calculado para C₁₄H₁₇NO₄ (M)⁺ 263,11576. Encontrado: 263,11538.

30

Ejemplo 3

Ácido (3R,4S)-1-N-bencil-3-hidroxi-2-pirrolidinona-4-carboxílico [(+)-6] y Ester dietílico del ácido (3S,4R)-1-N-bencil-3-hidroxi-2-pirrolidinona-4-carboxílico [(-)-5]

35

Una suspensión del éster crudo (+)-5 (191,8 g, 0,72 mol) en tampón fosfato de potasio (0,1 M, 0,1 M NaCl, pH 7,5, 10 L) se agitó en Novozyme[®] 435 (20,0 g) durante 5 h a 25°C. Se extrajo la enzima por filtración y el filtrado se saturó con cloruro de sodio. El éster sin reaccionar (-)-5 se separó por extracción con cloroformo (3 x 5 L). A continuación se llevó la mezcla acuosa a pH 1 con HCl (6 N) y se extrajo nuevamente con cloroformo (9 x 5 L). Luego se extrajo la fase acuosa con la mitad del volumen de EtOAc. Los extractos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto crudo del título (+)-6 en forma de sólido marrón claro (66,7 g, 39%). Los datos analíticos para (+)-6 (rendimiento: 1,78 mmol, 44%) y (-)-5 (rendimiento: 1,85 mmol, 46%) obtenidos de la hidrólisis enzimática de un pequeño lote (3,95 mmol) de (±)-5 purificado cromatográficamente son los siguientes:

45

Datos analíticos para (+)-6: p.f. (acetato de etilo) 144-146°C. [α]_D²⁰ + 62,3 (c = 1, EtOH). Exceso enantiomérico (HPLC del éster metílico en Chiralcel OD-H) 94,8%. ¹H-RMN (CDCl₃): δ ppm: 7,37-7,21 (5H, bm), 4,76 (4H (4H, bs, 2 x OH, H₂O), 4,70 (1H, d, J = 8,2 Hz), 4,46 (2H, dd, J = 4,6, 10,3), 3,44 (2H, m), 3,19 (1H, m). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ ppm: 174,7, 173,8, 135,1, 129,3, 128,6, 128,5, 72,6, 47,6, 46,1, 45,5. Análisis: Encontrado, C 61,36, H 5,56, N 5,92. C₁₂H₁₃NO₄ requiere C 61,27, H 5,57, N 5,95.

50

Datos analíticos para (-)-5: [α]_D²⁰ + 46,8 (c = 1,1 EtOH). Exceso enantiomérico (HPLC en Chiralcel OD-H) 97,7%.

55 Ejemplo 4

(3R,4R)-1-N-Bencil-3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina [(+)-7]

Se añadió gota a gota BF₃OEt₂ (170 mL, 1382 mmoles) a una suspensión del ácido (+)-6 (62 g, 264 mmoles) y NaBH₄ (40 g, 1057 mmoles) en THF (1 L) a 0°C. La mezcla se dejó en reposo durante 72 h. La reacción se interrumpió después con MeOH (500 mL) bajo enfriamiento con hielo (desgasificación) y el disolvente se evaporó. El residuo se trató a continuación con solución acuosa de HCl 6 N (1 L) durante 10 minutos seguido de evaporación. Se añadió NaOH (solución acuosa al 15%, 250 mL) hasta pH 12-14. La solución resultante se concentró al vacío hasta obtener un sólido, el cual se suspendió en cloroformo (1 L). Después de filtración a través de Celite, el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar un aceite que cristalizó lentamente al trabajarse con tolueno. Después de secado al vacío se obtuvo el compuesto (+)-7 en forma de sólido cristalino blanco (54 g, 261 mmoles, rendimiento 99%). [α]_D²⁰ + 37,3 (c = 1, MeOH), p.f. 54-56°C.

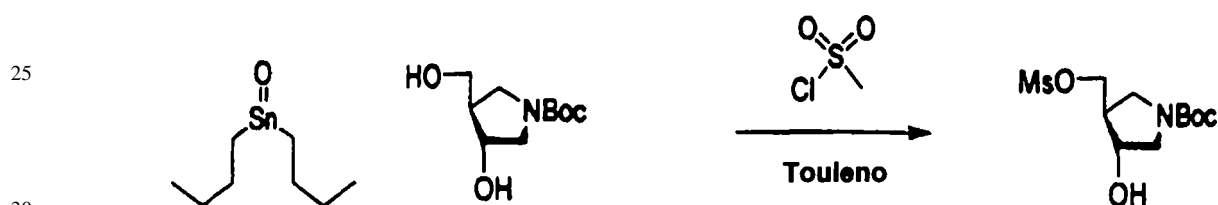
65

Ejemplo 5

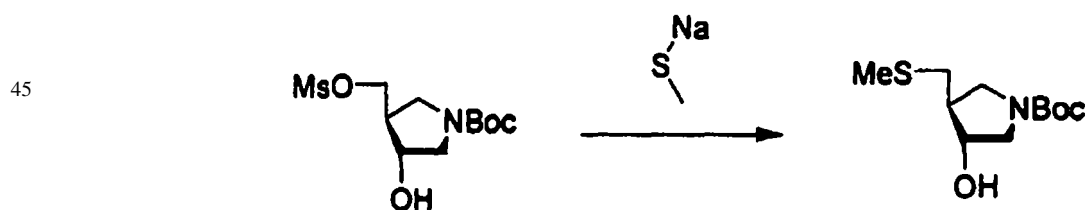
(3R,4R)-1N-terc-Butoxicarbonit-3-hidroxi-4-hidroxiometil-pirrolidina [(+)-8]

5 El compuesto crudo (+)-7 del paso anterior (60 g) se recogió en metanol (800 mL), se añadió Pd/C al 10% (12 g, tipo Degussa húmedo) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno durante 12 h para dar el compuesto crudo (3R,4R)-3-Hidroxi-4-hidroxiometil-pirrolidina (+)-1. El catalizador se eliminó por filtración y a la solución en metanol se añadió trietilamina (30 mL, 216 mmoles) y di-*terc*-butil bicarbonato (47,5 g, 218 mmoles) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h (exoterma leve). A continuación la mezcla se preabsorbió en sílice y se cromatografió por cromatografía tipo “dry-flash” (eluyente: CHCl₃:EtOAc:MeOH; 5:2:1 v/v/v para dar el compuesto (+)-8 en forma de jarabe color naranja claro (25,4 g, 59% a partir de (+)-6). El producto final contenía alrededor de un 15% (p/p) de una sal de trietilamonio la cual se puede extraer por cromatografía en columna de sílice (hexanos:acetato de etilo, 1:4). Los datos para (+)-8 completamente purificado son los siguientes: $[\alpha]_D^{20} + 15,4$ (c = 0,5, MeOH). ¹H-RMN (MeOH-d₄): δ ppm: 4,14 (m, 1H), 3,58-3,45 (m, 4H), 3,24-3,18 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 1,46 (s, 9H). ¹³C-RMN (MeOH-d₄): δ ppm (algunos picos se doblan debido a la lenta interconversión de los rotámeros): 156,99, 81,31, (73,10, 72,40), 63,06, (54,45, 54,03), (50,42, 49,75), (48,47, 48,03), 29,18.

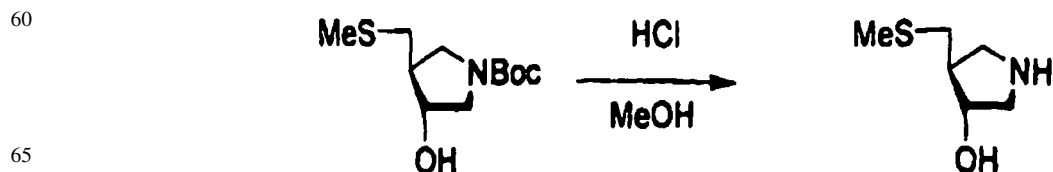
Ejemplo 6

(3S,4R)-3-Hidroxi-4-(metiltiometil)-pirrolidina

35 La amina protegida (7,75 g, 35,7 mmoles) y el óxido de dibutiltin (10,66 g, 42,8 mmoles) se suspendieron en tolueno (10 mL) y se calentaron a reflujo bajo las condiciones de Dean y Stark. La reacción se volvió homogénea a unos 100°C. La solución se calentó a reflujo durante 1,5 h más, se enfrió a -10°C y se añadió cloruro de metanosulfonilo (3,34 ml, 42,8 mmoles). La evolución de la reacción se monitorizó por cromatografía en capa fina (TLC). Después de 1 h, la reacción apareció incompleta y se dejó que se calentara a temperatura ambiente con agitación toda la noche, hasta que se completó la reacción. La cromatografía en columna de la solución directamente cargada en una columna de gel de sílice eluida con MeOH 5% v/v en diclorometano dio el mesilato (10,0 g, 33,9 mmoles, rendimiento 95%), en forma de un aceite incoloro.



55 El mesilato (10 g, 33,9 mmoles) se disolvió en DMF y se añadió tiometóxido de sodio (4,75 g, 67,7 mmoles) en pequeñas porciones. La solución se agitó toda la noche, se diluyó con tolueno, se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. La cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente MeOH 5% v/v en diclorometano) dio la 3-hidroxi-4-(metiltiometil)-pirrolidina N-protegida (8,2 g, 33,2 mmoles, rendimiento 98%) en forma de un aceite amarillo.



ES 2 318 504 T3

La 3-hidroxi-4-(metiltiometil)-pirrolidina N-protegida (8,2 g, 33,2 mmoles) se disolvió en metanol (40 mL, 33,2 mmoles) y se le añadió ácido clorhídrico (10 mL, 326 mmoles), y la solución resultante se concentró al vacío. Este paso se repitió, hasta que la TLC (7N NH₃ 10% v/v en MeOH-diclorometano) indicó desprotección total. La cromatografía en columna de sílice eluida con 7N NH₃ 10-20% en MeOH-diclorometano dio el compuesto del título (4,3 g, 29,2 mmoles, rendimiento 88%).

Ejemplo 7

10 Cribado de Hyrolasas

El éster racémico (\pm)-5 (50 \pm 5 mg, 0,2 mmoles) se agitó con MTBE (0,1 m) en un tubo de ensayo y luego se añadieron tampón fosfato (0,1 M, con 0,1 M NaCl, pH 7,5, 0,1 mL), agua (1,0 mL) y solución de rojo fenol (0,1% en agua, 0,01 mL). La preparación enzimática (5-50 mg) se añadió para iniciar la reacción, y se añadió NaOH (0,1 M) con una jeringa tal como se requería para mantener el indicador en un rojo rosado. Cuando 1,0 \pm 0,1 mL de la solución de NaOH (indicando aproximadamente hidrólisis del 50%) se había consumido (o después de 23 h, o cuando la reacción parecía haber cesado), se detuvo la reacción por adición de HCl (1M) a H 1 y la preparación enzimática se eliminó por filtración o por centrifugación. El filtrado o sobrenadante se saturó con NaCl (aprox. 750 mg) y se extrajo con EtOAc (3 x 1 mL). Los extractos secos (MgSO₄) se concentraron a presión reducida y se recogieron en metanol seco (2 mL). Esta solución se enfrió bajo argón en un baño de hielo-agua y se añadió trimetilsilildiazometano (2,0 M en hexano) hasta que se mantuvo el color amarillo del reactivo. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se concentró a presión reducida. La mezcla resultante de los ésteres etílico y metílico se analizó por HPLC utilizando columna de Chiracel OD-H eluida con hexano-isopropanol.

25

Ejemplo 8

Hidrólisis con Esterasa de Hígado de Cerdo (PLE)

30 Método (a).- Una solución del éster (\pm)-5 (0,5 g, 1,98 mmoles) en tolueno (0,2 mL) se agitó con tampón fosfato (1,0 M, pH 7,5, 2,0 mL) y PLE (5 mg) durante 54 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetona y se filtró a través de un lecho de Celite en papel filtro Whatman 50. El filtrado se extrajo tres veces con acetato de etilo y los extractos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida para dar (\pm)-5 (0,25 g, 50%, e.e. 84%).

35 Método (b).- Una solución del éster racémico (\pm)-5 (50 mg, 0,2 mmoles) en tolueno (0,1 mL) se agitó con tampón fosfato (0,1 M, con NaCl 0,1 M, pH 7,5, 0,1 mL), agua (0,1 mL), solución de rojo fenol (0,1% en agua, 0,01 mL) y PLE (4,6 mg). Se añadió NaOH (0,1 M) con una jeringa tal como se requería para mantener el indicador en un rojo rosado. Cuando 1,4 mL de la solución de NaOH se había consumido (indicando aproximadamente conversión del 70%), la mezcla de reacción se diluyó con acetona y se filtró a través de un lecho de Celite en papel filtro Whatman 50. El filtrado se extrajo tres veces con acetato de etilo y los extractos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida para dar (\pm)-5 (10 mg, e.e. 93%).

Ejemplo 9

45

Hidrólisis con Novozyme 435 utilizando acetona como codisolvente

El éster crudo (\pm)-5 (319 g, 1,21 mol) se disolvió en acetona (320 mL) y a esta solución se añadió tampón K₂HPO₄ (3,2 L, 0,5 M, utilizando un medidor de pH para ajustar el pH a 7,5 con KH₂PO₄). Se añadió Novozyme 435 (30,0 g) y la suspensión resultante se agitó durante 6 h a 27°C. A continuación la enzima se eliminó por filtración a través de Celite y el residuo se lavó con tampón K₂HPO₄ (300 mL). El filtrado se saturó con NaCl (~750 g) y el éster sin reaccionar (-)-5 se eliminó por extracción con cloroformo (3 x 400 mL). La mezcla acuosa se llevó a pH 1 con HCl (150 mL, 12 N), se volvió a saturar con NaCl (100 g) y se volvió a extraer con acetato de etilo (6 x 400 mL). Los extractos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto crudo del título (+)-6 en forma de sólido blanquecino, el cual cristalizó de acetato de etilo para dar (+)-6 (106 g, 72%) en forma de sólido blanco. P.f. 144-146°C. $[\alpha]_D^{20} +62,3$ (c = 1,0, EtOH).

Ejemplo 10

60

1-N-Bencil-3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidina 7 por reducción del éster 5

Se enfrió una solución del éster 5 (3,1 g, 12,4 mmoles) en THF en un baño de hielo-agua y luego se añadió el complejo borano-sulfuro de dimetilo (6,0 mL, 58 mmoles) mediante una jeringa. Se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente y luego se calentó a reflujo durante 2 h. La reacción se enfrió, se interrumpió por adición de pequeñas porciones de metanol y se concentró a presión reducida en gel de sílice (aprox. 15 mL). El sílice se aplicó en la parte superior de una columna corta de gel sílice que se eluyó con acetato de etilo. Las fracciones de eluyente que contenían el producto se concentraron a presión reducida y el residuo se agitó en TFA - agua (1:1, 30 mL) durante

toda la noche. La evaporación del disolvente y el paso a través de una cromatografía de intercambio iónico (Amberlite IRA-900, Cr-form, eluyente metanol-agua, 1:1 v/v) dio un aceite que fue de nuevo cromatografiado en gel de sílice (diclorometano-metanol 6:1-4:1 como eluyente) para dar el compuesto del título (1,50 g, 7,2 mmoles, 58%).

5 Aunque la invención ha sido descrita a modo de ejemplo, se debería entender que se pueden efectuar variaciones o modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Además, cuando existen equivalentes conocidos a características específicas, tales equivalentes son incorporados como si fueran referidos específicamente en la descripción.

Aplicabilidad industrial

10

La invención proporciona un procedimiento mejorado para preparar (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina y su enantiómero (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, ambos de los cuales son valiosos intermedios en la preparación de los inhibidores de purina nucleósido fosforilasa. Dichos inhibidores son agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de varias enfermedades, particularmente cánceres.

15

Referencias citadas en la descripción

20 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 25
- NZ 03000186 W[0002]
 - NZ 2004000186 W[0066]
 - WO 2005033076 A [0010] [0011]
 - WO 2004069856 A [0066]
 - WO 2004018496 A [0066]
 - WO N22004000017 A [0066]

30

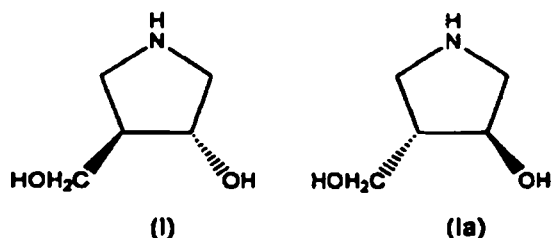
Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 35
- K. MAKINO; Y. ICHIKAWA. *Tetrahedron Letters*, 1998, vol. 39, 8245 [0003]
 - S. KARLSSON; H. E. HÖGBERG. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, vol. 12, 1977 [0004]
 - R. GALEAZZI; G. MARTELLI; G. MOBBILI; M. ORENA; S. RINALDI. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, vol. 15, 3249 [0005]
 - 40
 - V. V. FILICHEV; E. B. PEDERSEN. *Tetrahedron*, 2001, vol. 57, 9163 [0006]
 - V. V. FILICHEV; M. BRANDT; E. B. PEDERSEN. *Carbohydrate Research*, 2001, vol. 333, 115 [0006]
 - 45
 - S. U. HANSEN; M. BOLS. *Acta Chemica Scandinavica*, 1998, vol. 52, 1214 [0007]
 - L. M. LEVY; J. R. DEHLI; V. GOTOR. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14, 2053 [0009]
 - THEODORA W. GREENE; PETER G. M. WUTS. *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley-Interscience, 15 May 1999 [0051]
 - 50
 - KAMETANI, T.; KIGAWA, Y.; IHARA, M. *Tetrahedron*, 1979, vol. 35, 313-316 [0054]
 - FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, 2004, 94-119 [0058] [0058]
 - 55
 - ANDERSON, E.M.; LARSON, K.M.; KIRK, O. *Biocatalysis Biotransformation*, 1997, vol. 16, 181-204 [0058]
 - ANDERSON, E.M.; LARSON, K.M.; KIRK, O. *Biocatalysis Biotransformation*, 1997, vol. 16, 181-204 [0059]
 - 60
 - BARRETT, A.G.M. *Comprehensive Organic Synthesis*. Pergamon, 1991, vol. 8, 237-238249-251 [0061]

65

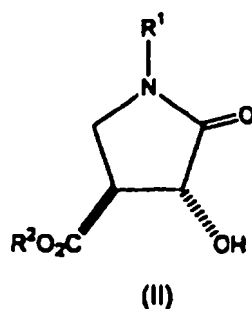
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, compuesto de fórmula (I), o (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, compuesto de fórmula (Ia):



incluyendo los pasos siguientes:

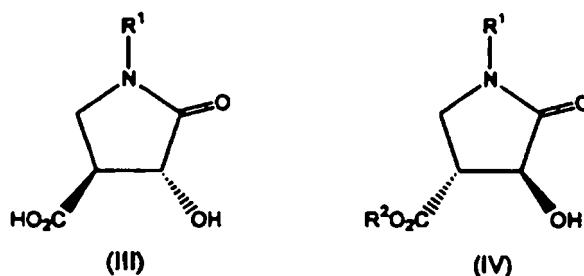
paso (a): hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas de un compuesto racémico de 3,4-*trans*-pirrolidino-na disustituida de fórmula (II):



donde R¹ representa bencilo o benzhidrilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente por halógeno, alquilo o alcoxi; y R² representa arilo o alquilo de cadena lineal o ramificada o aralquilo, cualquier de los cuales puede estar sustituido opcionalmente por halógeno, alquilo o alcoxi;

para dar o:

mezcla (i): un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituida de fórmula (III) y el compuesto de pirrolidinona sin reaccionar de fórmula (IV):

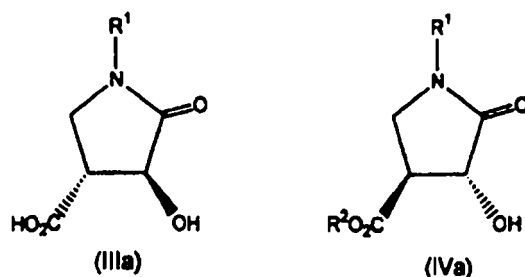


donde R¹ y R² son tal como se definen anteriormente;

o

ES 2 318 504 T3

mezcla (ii): un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituida de fórmula (IIIa) y el compuesto de pirrolidinona sin reaccionar de fórmula (IVa):



donde R^1 y R^2 son tal como se definen anteriormente;

donde la hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas se lleva a cabo utilizando una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (III), o una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (IIIa);

paso (b): separación del compuesto de fórmula (III) del compuesto de fórmula (IV) de la mezcla (i), o separación del compuesto de fórmula (IIIa) del compuesto de fórmula (IVa) de la mezcla (ii); y

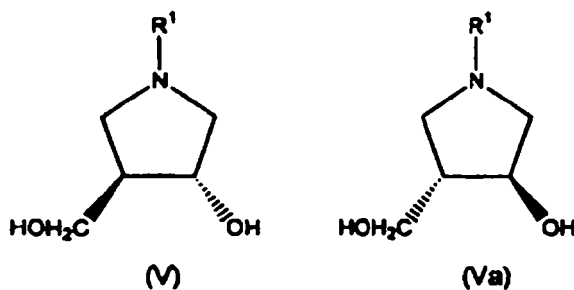
paso (c): transformación del compuesto de fórmula (III) o el compuesto de fórmula (IVa) en el compuesto de fórmula (I), o transformación del compuesto de fórmula (IV) o el compuesto de fórmula (IIIa) en el compuesto de fórmula (Ia).

2. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 1, donde el paso (a) da la mezcla (i) utilizando una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (III), o la mezcla (ii) utilizando una enzima capaz de producir un exceso enantiomérico del compuesto (IIIa).

3. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la enzima utilizada en el paso (a) es una lipasa o una esterasa.

4. Procedimiento según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el paso (c) es la transformación del compuesto de fórmula (III) en el compuesto de fórmula (I) o la transformación del compuesto de fórmula (IIIa) en el compuesto de fórmula (Ia).

5. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 4, donde la transformación se efectúa por medio de un proceso que incluye el paso de reducción del compuesto de fórmula (III) o fórmula (IIIa) para dar un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidina disustituida de fórmula (V) o fórmula (Va):



donde R^1 es tal como se define en la reivindicación 1.

6. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 5 que incluye además el paso de sustitución del grupo R^1 del compuesto de fórmula (V) o fórmula (Va) con hidrógeno para dar el compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia).

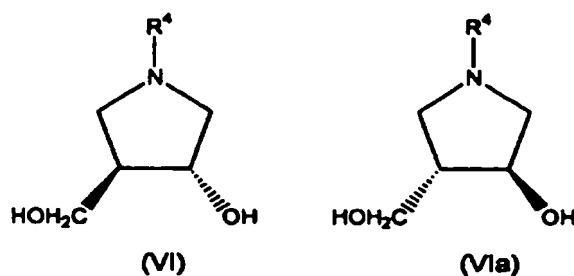
7. Procedimiento según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la separación del compuesto de fórmula (III) del compuesto de fórmula (IV) en el paso (b) se lleva a cabo por extracción del compuesto de fórmula (IV) de una solución acuosa que contiene el compuesto de fórmula (IV) y una forma de sal carboxilato del

compuesto de fórmula (III) utilizando un primer disolvente inmiscible en agua, reduciendo luego el pH de la mezcla resultante para convertir la forma de sal carboxilato del compuesto de fórmula (III) en la forma de ácido carboxílico del compuesto de fórmula (III); extrayendo luego la mezcla resultante de nuevo con un segundo disolvente inmiscible en agua.

5

8. Procedimiento según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia) se convierte en un compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidina disustituida de fórmula (VI) o fórmula (VIa):

10



15

20

donde R⁴ es un grupo N-protector.

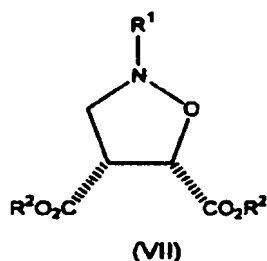
25

9. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 8, donde el compuesto de fórmula (I) se convierte en el compuesto de fórmula (VI) por tratamiento con un agente alcoxycarbonilante, un agente ariloxycarbonilante o un agente aralcoxycarbonilante, opcionalmente en presencia de una base.

30

10. Procedimiento según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de fórmula (II) se prepara por medio de un proceso que incluye el paso de eliminación reductora del enlace N-O de un compuesto de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (VII), y ciclación *in situ* para dar el compuesto de fórmula (II):

35



40

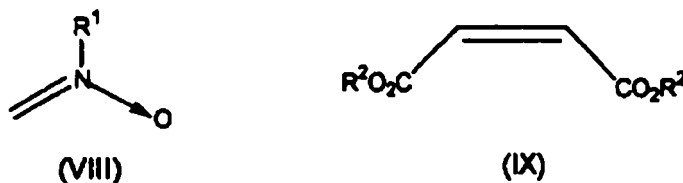
45

donde R¹ y R² son tal como se definen en la reivindicación 1.

50

11. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 10, donde el compuesto de fórmula (VII) se prepara por 1,3-cicloadición de una nitrona de fórmula (VIII) y un alqueno de fórmula (IX):

55



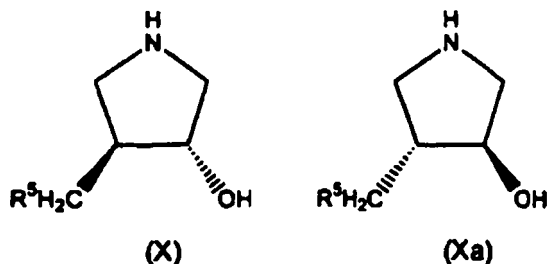
60

65 donde R¹ y R² son tal como se definen en la reivindicación 1.

12. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 1 que incluye además la conversión del compuesto de fórmula (I) o fórmula (Ia) en un compuesto de fórmula (X) o (Xa):

5

10



15

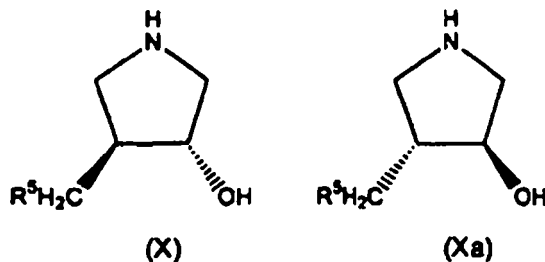
donde R⁵ se selecciona entre H, OH y SH, o de aquloxi, aralquiloxi, ariloxi, alquiltio, aralquiltio y ariltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi.

20

13. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 1 que incluye además la preparación del compuesto de fórmula (II) por medio del proceso de la reivindicación 10 e incluye además la conversión del compuesto de fórmula (I) o (Ia) en un compuesto fórmula (X) o (Xa):

25

30



35

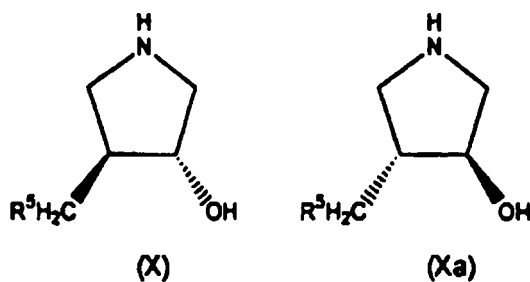
donde R⁵ se selecciona entre H, OH y SH, o de aquloxi, aralquiloxi, ariloxi, alquiltio, aralquiltio y ariltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi.

40

14. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 12 o reivindicación 13 que incluye además la reacción del compuesto de fórmula (X) o (Xa) con un compuesto de fórmula (XI) para dar el compuesto de fórmula (XII) o (XIIa):

45

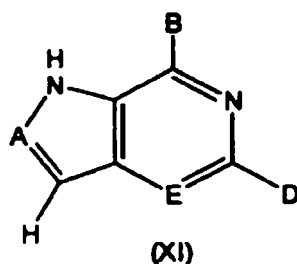
50

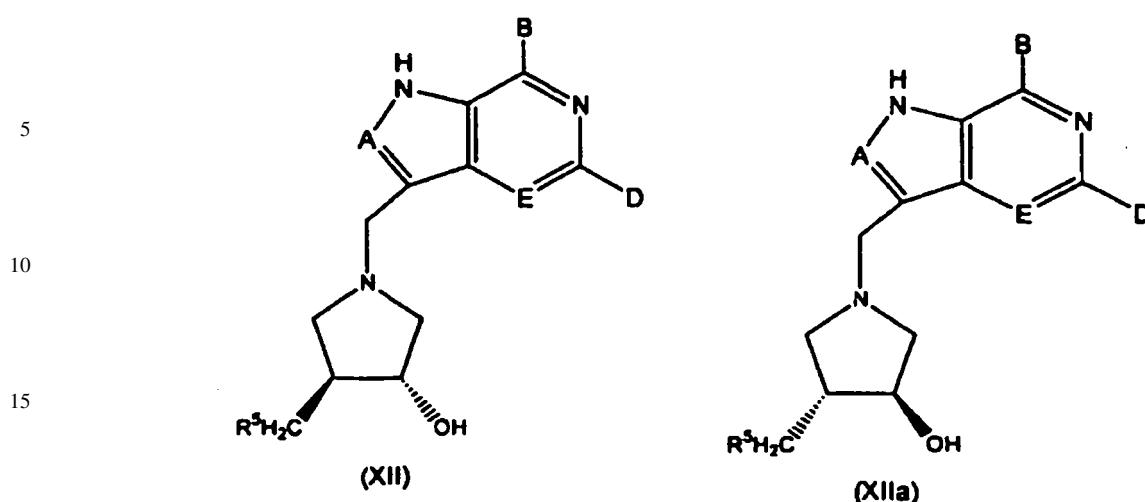


55

60

65





donde

25 A se selecciona entre N, CH y CR⁶, donde R⁶ se selecciona entre halógeno, OH y NH₂, o R⁶ se selecciona entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi, o R⁶ se selecciona entre NHR⁷, NR⁷R⁸ y SR⁹, donde R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi;

30 B se selecciona entre OH, NH₂, NHR¹⁰, SH, hidrógeno y halógeno, donde R¹⁰ se selecciona entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi;

35 D se selecciona entre OH, NH₂, NHR¹¹, hidrógeno, halógeno y SCH₃, donde R¹¹ se selecciona entre alquilo, aralquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido por halógeno, alquilo saturado o no saturado de cadena ramificada o lineal, alcoxi, aralquiloxi o ariloxi; y

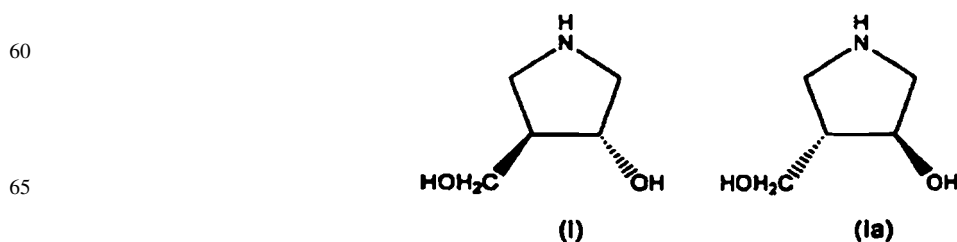
E se selecciona entre N y CH.

40 15. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 14, donde el compuesto de fórmula (XI) se convierte en un compuesto de fórmula (XIII), y se hace reaccionar el compuesto de fórmula (X) o (Xa) con un compuesto de fórmula (XIII) para dar un compuesto de fórmula (XII) o (XIIa):



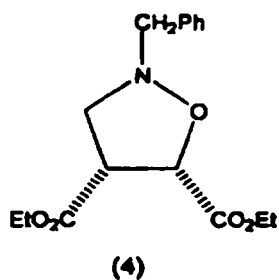
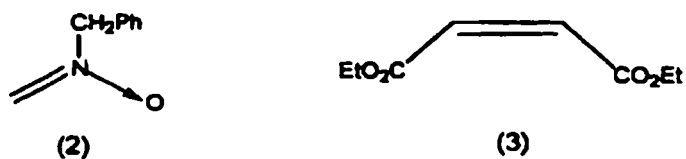
55 donde A, B, D y E son tal como se definen en la reivindicación 14, cada uno de los cuales y NH en el anillo de 5 miembros pueden ser protegidos con grupos protectores adecuados.

60 16. Procedimiento para la preparación de (3*R*,4*R*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, compuesto de fórmula (I), o (3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-hidroximetilpirrolidina, compuesto de fórmula (Ia):

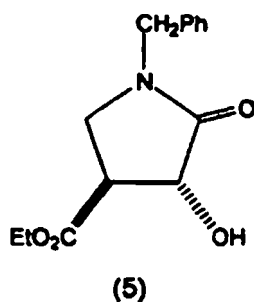


que incluye los pasos de:

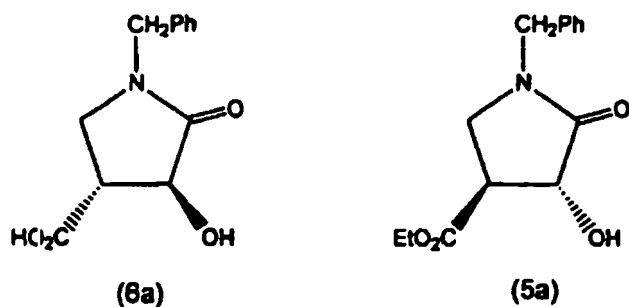
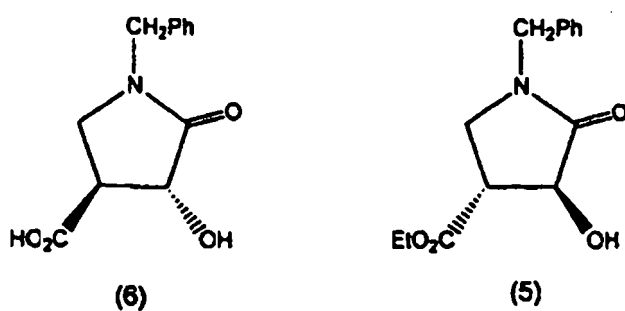
- (i) 1,3-cicloaddición de una nitrona de fórmula (2) y un alqueno de fórmula (3) para dar un compuesto de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (4):



- (ii) eliminación reductora del enlace N-O del compuesto de 4,5-*cis*-isoxazolidina disustituida de fórmula (4) y ciclación *in situ* para dar el compuesto de 3,4-*trans*-pirrolidinona disustituida de fórmula (5):

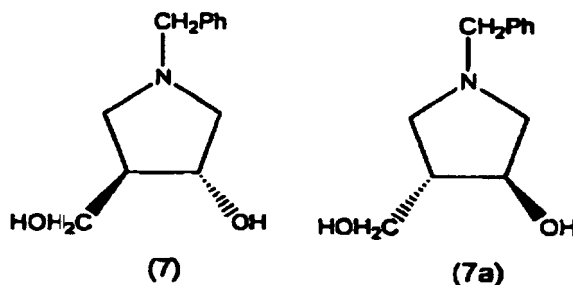


- (iii) hidrólisis enantioselectiva catalizada por enzimas del compuesto de fórmula (5) para dar una mezcla de un compuesto de fórmula (6) y el compuesto sin reaccionar de fórmula (5), o una mezcla de un compuesto de fórmula (6a) y el compuesto sin reaccionar de fórmula (5a):



ES 2 318 504 T3

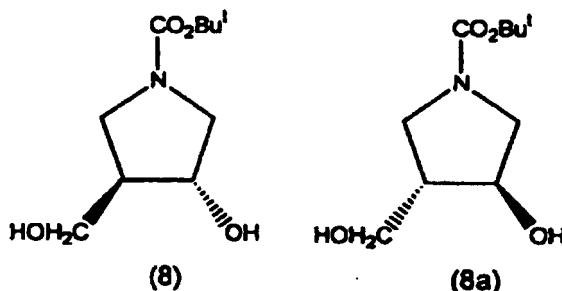
- (iv) separación del compuesto de fórmula (6) del compuesto de fórmula (5), o separación del compuesto de fórmula (6a) del compuesto de fórmula (5a):
- (v) reducción del compuesto de fórmula (6) o (5a) para dar un compuesto de fórmula (7), o reducción del compuesto de fórmula (6a) o (5) para dar un compuesto de fórmula (7a):



- (vi) sustitución del grupo CH₂Ph por hidrógeno en el compuesto de fórmula (7) para dar el compuesto de fórmula (I), o sustitución del grupo CH₂Ph por hidrógeno en el compuesto de fórmula (7a) para dar el compuesto de fórmula (Ia).

17. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 16 que incluye además el paso de:

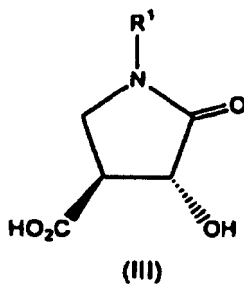
- (vii) conversión del compuesto de fórmula (I) en un compuesto de fórmula (8), o conversión del compuesto de fórmula (Ia) en un compuesto de fórmula (8a):



por tratamiento del compuesto de fórmula (I), o el compuesto de fórmula (Ia) con di-*tert*-butildicarbonato o di-*tert*-butildicarbonato

18. Procedimiento según se reivindica en la reivindicación 17, donde el compuesto de fórmula (I), o el compuesto de fórmula (Ia), no se aísla, y la conversión del compuesto de fórmula (I) en el compuesto de fórmula (8), o el compuesto de fórmula (Ia) en el compuesto de fórmula (8a), en el paso (vii) se efectúa *in situ*.

19. Un compuesto de fórmula (III):



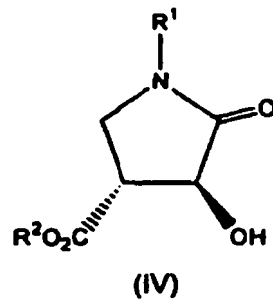
donde R¹ es tal como se define en la reivindicación 1.

20. Un compuesto de fórmula (IV):

5

10

15



donde R¹ y R² son tal como se definen en la reivindicación 1.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65