

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-109669-A-00006-0000

Fecha: 2012-09-07 16:21:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 28

Act. 523 RESPUESTA Folios: 27

Expediente: 06-109.669A

Titular: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

Asunto: CONTESTACIÓN A REQUERIMIENTO.

MAURICIO PATIÑO BONNET, mayor de edad, con domicilio en la ciudad de Bogotá D.C., identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de apoderado de **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.**, por medio del presente memorial acudo a la Dirección de Nuevas Creaciones de la Superintendencia de Industria y Comercio con el fin de **DAR RESPUESTA** oportuna al Oficio No. **6698**, de acuerdo como sigue:

CLARIDAD Y NOVEDAD

Con el fin de superar las objeciones que por claridad y novedad planteó su Despacho, presento nuevo pliego reivindicatorio compuesto por veinticinco (25) reivindicaciones, en el cual se han realizado las siguientes modificaciones conforme con lo sugerido por el señor examinador:

1. El nuevo pliego reivindicatorio ha limitado la definición de R^1 al grupo alifático específico C_{1-4} , el cual se encuentra debidamente soportado en las páginas 3, 4 y 10 del texto de patente como fue presentado. Adicionalmente, las definiciones de R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se han limitado a una generalización razonable de los ejemplos, los cuales, valga la pena mencionar fueron aceptados y concedidos en la solicitud madre.
2. La nueva reivindicación 1, ha incluido dentro de su alcance la antigua reivindicación 5, estableciendo con claridad el método para retirar los grupos G en la etapa (d). En consecuencia, la nueva reivindicación

independiente 1 define todas las características técnicas esenciales de la invención.

En este sentido, me permito anotar que la nueva reivindicación 5 (la antigua reivindicación 6) referente al ácido empleado en la etapa (d), no es una reivindicación que defina una característica técnica esencial de la invención, sino por el contrario define una característica que limita el objeto de protección. Por lo tanto, dicha reivindicación no debe ser incluida en la reivindicación independiente 1.

3. Las nuevas reivindicaciones 11 y 13 (antiguas reivindicaciones 12 y 14 respectivamente) han incluido dentro de su alcance la etapa (5) de la antigua reivindicación 15, estableciendo con claridad el proceso para desproteger el resto ácido bórico. Adicionalmente y conforme con las modificaciones realizadas a la nueva reivindicación independiente 1, la nueva reivindicación 13 especifica la proporción de disolvente éter que tiene baja miscibilidad con agua.
4. Las reivindicaciones 20, 21, 24, 30 a 32 han sido eliminadas del nuevo pliego reivindicatorio.

Me permito anotar que las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio no amplían la materia objeto de protección, sino por el contrario limitan la misma permitiendo una interpretación inequívoca del alcance de protección y su comparación con el estado del arte.

Así las cosas, las modificaciones al nuevo pliego reivindicatorio dan por superadas las objeciones que por claridad y novedad planteó su Despacho, toda vez que el alcance de procesos reivindicados es acorde con lo sustentado en el pliego descriptivo y se diferencia del estado de la técnica.

NIVEL INVENTIVO

El Despacho considera que los documentos D1 y D2 afectan el nivel inventivo de las nuevas reivindicaciones independientes 1, 12, 13 y 21 (antiguas reivindicaciones 1, 13, 14 y 25) de la solicitud en estudio. Adicionalmente, el

Despacho también afirma que los documentos D1 y D3 afectan el nivel inventivo de las nuevas reivindicaciones independientes 13 y 21.

Establece el artículo 18:

"Art. 18

Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El problema técnico a ser resuelto por la presente invención consiste en proporcionar un proceso de reacción mejorado para producir esteres bóricos en los cuales un disolvente de éter con una baja miscibilidad con agua es utilizado como disolvente principal (i.e. al menos 70% v/v de la mezcla de reacción).

D1 describe procesos en los cuales se emplea Tetrahidrofurano (THF) como disolvente primario (60%-72% v/v de la mezcla de reacción) bajo condiciones anhidridas. En donde es utilizado éter dietilo (ejemplos 1, 2 y 3) en **D1**, dicho disolvente está presente como un disolvente secundario (28%-40% v/v de la mezcla de reacción) relativo al disolvente primario, THF. Estas enseñanzas se alejan de la presente invención, en donde el uso de un disolvente con baja miscibilidad con agua como disolvente primario es una característica técnica esencial de la misma. Nótese que el disolvente de éter puede ser un disolvente de coordinación o puede estar presente junto con un co-disolvente de coordinación, pero en ambos casos es el disolvente primario en la mezcla de reacción.

Conforme con las enseñanzas de **D1**, una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica no consideraría (i) hacer uso de bien sea un disolvente éter distinto a THF como el disolvente primario, o (ii) ajustar las proporciones del disolvente éter con baja miscibilidad con agua y el co-disolvente coordinante.

En consecuencia, el uso de un éter disolvente con baja miscibilidad con agua, en una cantidad de al menos 70% v/v del total de la mezcla de reacción, no podría haber sido una modificación obvia a partir del proceso revelado en **D1**.

En este sentido y con base en las indicaciones de **D1**, una persona normalmente versada en el oficio no habría tenido ninguna expectativa razonable, previo a la invención, de que el uso del mencionado disolvente hubiera resultado en las características ventajosas de la invención, a saber, (i) evitar los efectos perjudiciales causados por la presencia del agua, (ii) evitar el requerimiento de la exclusión rigurosa del agua y (iii) permitir el aumento proporcional a procesos de gran escala.

El Despacho afirma que **D2** provee la motivación para resolver el problema técnico objetivo de modificar el procedimiento reivindicado de **D1** de tal forma que puede ser realizado en una escala de multi-kilogramo sin afectar el rendimiento o la pureza.

D2 describe una reacción de homologación bajo el título "*PREPARACIÓN: MATERIALES PARA COMENZAR*" (empezando en la columna 7, línea 8). Bajo este título se afirma que esteres de ácidos alfa-amino bóricos (en una forma de sal amino o amino libre) pueden ser preparadas de acuerdo con el subsiguiente procedimiento, el cual es una modificación de Matteson, et al., J. Am. Chem. Soc. 103:5241 (1981) (ver Anexo 1). **D2** describe la homologación de un éster de ácido bórico 2 para producir un éster alfa-cloro bórico 3 (ver columna 7, líneas 57-61). Así mismo, dicho documento afirma que la homologación puede ser llevada a cabo en "dimetoxietano, tetrahidrofurano, un éter alquilo u otro disolvente conveniente".

No obstante lo anterior, **D2** no revela ningún ejemplo de la reacción de homologación, u otros disolventes de éter alquilo ni tampoco divulga una cantidad específica de éter alquilo relativa al resto de la mezcla de reacción.

Por el contrario, **D2** soporta el proceso homologación revelado en la descripción de Matteson, et al., J. Am. Chem. Soc. 103:5241 (1981), el cual a su vez se refiere a otra referencia del mismo autor - Matteson, et al., J. Am. Chem. Soc. 102:7588 (1980) (ver Anexo 2). Ninguna de estas referencias describe, enseña o divulga un éter alquilo como un disolvente apropiado para las reacciones de homologación.

Por consiguiente, **D2** no provee ninguna motivación para que una persona del oficio remplazara el disolvente primario THF revelado en **D1** por un disolvente de éter alquilo que tenga baja miscibilidad con agua como disolvente primario, o para ajustar las proporciones del disolvente primario relativo al co-disolvente coordinante.

En consecuencia, una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica no consideraría razonable, según las enseñanzas de **D1 y D2** usar éter metilo tert-butilo, éter etilo tert-butilo, éter metilo tert-amilo o éter isopropilo en una proporción de al menos 70% v/v de la mezcla de la reacción en combinación con tetrahidrofurano, dioxano o agua como un co-disolvente coordinante en una proporción no mayor al 20% v/v de la mezcla de la reacción, como es reivindicado en la invención de mi representada.

Para finalizar, las nuevas reivindicaciones 13 y 21 incluyen ambas un paso de homologación de éster bórico, el cual no es descrito en **D3**. Adicionalmente y siguiendo con la misma línea de argumentación **D1 y D2** no sugieren el uso de éter metilo tert-butilo, éter etilo tert-butilo, éter metilo tert-amilo o éter isopropilo en una proporción de al menos 70% v/v de la mezcla de la reacción en combinación con tetrahidrofurano, dioxano o agua como un co-disolvente coordinante en una proporción no mayor al 20% v/v de la mezcla de la reacción, como es reivindicado en la invención de mi representada.

Así entonces, la presente invención es inventiva a la luz de **D1, D2 y D3**, toda vez que las diferencias existentes entre los procesos revelados no son obvias y evidentes a partir de las enseñanzas de dichos documentos y tienen un efecto inesperado, a saber, (i) evitar los efectos perjudiciales causados por la presencia del agua, (ii) evitar el requerimiento de la exclusión rigurosa del agua y (iii) permitir el aumento proporcional a procesos de gran escala.

ANEXOS

1. Nuevo pliego reivindicatorio compuestos por veinticinco (25) reivindicaciones.
2. Matteson, et al., J. Am. Chem. Soc. 103:5241 (1981).
3. Matteson, et al., J. Am. Chem. Soc. 102:7588 (1980).

De acuerdo con todo lo expuesto, solicito en forma muy comedida y respetuosa a la Sr. Jefe de la Dirección de Nuevas Creaciones se sirva tener en cuenta los argumentos y documentos aportados junto con el presente memorial y, de conformidad con ello, se sirva conceder el privilegio de patente a la invención de mi representada.

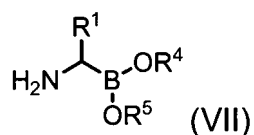
Del señor Jefe de la Dirección de Nuevas Creaciones,



MAURICIO PATIÑO BONNET
C.C. 11.342.699 de Zipaquirá
T.P. 73583 del C.S. de la J.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un compuesto éster amio bórico de formula (VII)



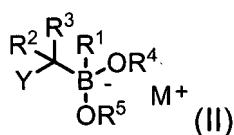
O un adición de ácido del mismo, en donde

R¹ es metilo, etilo, propilo, alilo, propargilo, butilo, isobutilo, vinilo, 1- propenilo, 1- butenilo, etinilo, 1- propinilo, 1- butinilo, ciclopropilo, ciclobutilo, bencilo, fenetilo, p naftimetilo; y

R⁴ y R⁵, tomados en conjunto con el oxígeno que interviene y los átomos de boro, formando un anillo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido teniendo 0-2 anillos adicionales hetero átomos seleccionados de N, O o S;

Dicho proceso comprende:

- (a) Proporcionado un complejo "ate" de boro de fórmula (II),



En donde

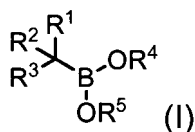
Y es halógeno;

M⁺ es seleccionado del grupo consistente en Li⁺, Na⁺, y K⁺;

R² es cloro; y

Cada R¹, R⁴ y R⁵ son como se definieron anteriormente;

- (b) Contactando el complejo "ate" de boro de fórmula (II) con un ácido Lewis seleccionado del grupo consistente en bromuro de zinc, cloruro de zinc, bromuro férrico, y cloruro férrico para alcanzar el compuesto éster bórico de fórmula (I)



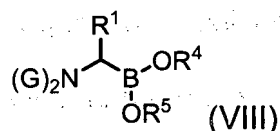
En donde cada uno de R1 a R5 son como se definieron anteriormente, dicho paso de contacto siendo conducido en una mezcla de reacción que comprende:

Un solvente éter que tiene baja miscibilidad con agua seleccionado del grupo consistente en tert-butilo metilo éter, tert-butilo etilo éter, tert-amilo metilo éter, isopropilo éter y mezclas de las mismas y un co- solvente coordinando que no constituya más del 20% V/V de la mezcla de reacción;

En donde la solubilidad del agua en el solvente de éter que tiene menos miscibilidad con el agua es menos de 5% p/p; y

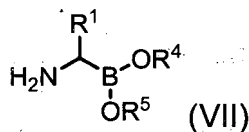
En donde el solvente de éter que tiene menos miscibilidad con agua constituye al menos el 70% v/v de la mezcla de reacción;

(c) Tratando el compuesto éster bórico de fórmula (I) con un reactivo de fórmula $M^1-N(Si(R^6)_3)_2$, en donde M^1 es un metal alcalino y cada R^6 independientemente es seleccionado del grupo consistente en metilo, etilo, propilo y butilo, para formar un subproducto de fórmula M^1-Cl y un compuesto de fórmula (VIII)



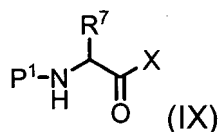
En donde cada G es $-Si(R^6)_3$ y R^1 a R^5 son como se definieron anteriormente; y

(d) Removiendo los grupos G para formar un compuesto de fórmula (VII)



o una sal de adición ácida de los mismos, en donde el paso (d) comprende tratar el compuesto de fórmula (VIII) con un ácido y aislando el compuesto de fórmula (VII) como la sal de adición ácida.

- a
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción en el paso (c) comprende un solvente orgánico en el cual el subproducto $M^1\text{-Cl}$ tiene una baja solubilidad.
 3. El proceso de la reivindicación 2, en donde M^1 es li.
 4. El proceso de la reivindicación 3 en donde la mezcla de reacción en el paso (c) comprende un solvente orgánico seleccionado del grupo consistente en metil ciclo hexano, ciclo hexano, heptano, hexano, tolueno, y mezclas de los mismos.
 5. El proceso de la reivindicación 1 en donde el ácido del paso (d) es ácido tri fluoruacético.
 6. El proceso de la reivindicación 1 en donde el paso (c) además comprende el filtrado de la mezcla de reacción para proveer un filtrado que comprende el compuesto de la fórmula (VIII).
 7. El proceso de la reivindicación 6 en donde en el paso (c) , el reactivo de fórmula $M^1\text{-N}(\text{Si}(\text{R}^6)_3)_2$ es adicionado a la mezcla de reacción como una solución que comprende tetrahidrofurano antes de filtrar la mezcla de reacción.
 8. El proceso de la reivindicación 6, en donde el filtrado es usado directamente en el paso (d).
 9. El proceso de la reivindicación 1 que además comprende el paso:
 - (e) uniendo el compuesto de fórmula (VII) con el compuesto de fórmula (IX):



En donde

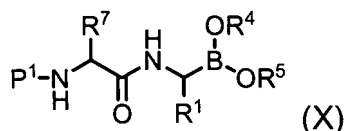
P¹ es un grupo amino bloqueando un grupo funcional;

R⁷ es seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, metilo, metilo – R⁸; y

R⁸ es seleccionado del grupo metoxi, tiometilo, fenilo, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tazolilo, isotiazolilo, piridil, piridazinil, pirimidinil, pirazinil; y

X es OH o un éster activado

Para formar un compuesto de fórmula (X):

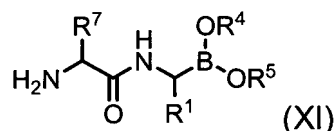


En donde cada uno de P¹, R¹, R⁴, R⁵, y R⁷ son como se definieron anteriormente.

10.El proceso de la reivindicación 9 en donde P1 es un grupo escindible de protección.

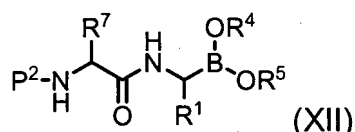
11.El proceso de la reivindicación 10 que adicionalmente comprende los pasos:

(f) Escindiendo el grupo de protección P¹ para formar un compuesto de fórmula (XI)



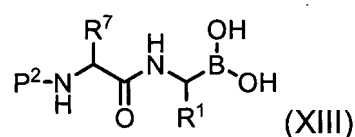
O una sal de adición ácida de la misma, en donde cada uno de R¹, R⁴, R⁵, and R⁷ son como se definieron anteriormente;

(g) Uniendo el compuesto de la fórmula (XI) con un reactivo de fórmula P^2-X , en donde P^2 es un grupo amino bloqueando el grupo funcional y X es un éster activado, para formar un compuesto de fórmula (XII):



En donde cada uno de P^2 , R^1 , R^4 , R^5 , y R^7 son como se definieron anteriormente; y

(h) Desproteger el grupo funcional de ácido bórico para formar un compuesto de fórmula (XIII):

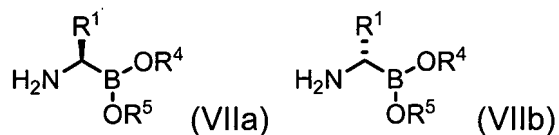


O un ácido bórico anhídrido del mismo, que comprende los pasos:

- i. Proveer una mezcla bifásica que comprende el compuesto de fórmula (XIII), un ácido bórico orgánico aceptante seleccionado del grupo que consiste en ácido fenil bórico, ácido bencil bórico, ácido butilbórico, ácido isobutilbórico, ácido pentilbórico, ácido hexilbórico, y ácido ciclohexilo bórico, un alcohól inferior seleccionando del grupo consistente en metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, sec-butanol, tert- butanol un solvente hidrocarbonado C_{5-8} , y ácido mineral acuoso;
- ii. Agitando la mezcla bifásica para alcanzar el compuesto de fórmula (XIV)
- iii. Separar las capas de solvente; y
- iv. Extraer el compuesto de fórmula (XIV) o un ácido bórico anhídrido del mismo un solvente orgánico

En donde cada uno de P^1 , R^1 , y R^7 son como se definieron anteriormente.

12. Un proceso para preparar un compuesto de éster aminobórico de fórmula (VIIa) o (VIIb)



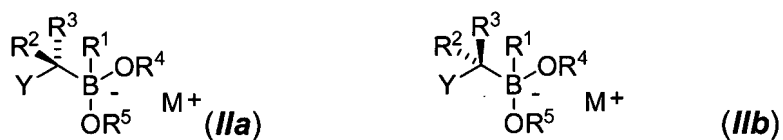
o una sal de adición ácida de la misma, en donde:

R¹ es metil, etil, propil, alilo, propargil, butilo, isobutilo, vinilo, 1- propenil, 1-btenil, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, ciclopropilo, ciclobutilo, bencilo, fenetilo, o naftimetilo; y

R⁴ and R⁵ tomados en conjunto con el oxígeno interviniente y átomos de boro, forman un éster bórico cíclico quirál opcionalmente sustituido de 5 a 10 miembros teniendo 0-2 anillos adicionales hetero átomos seleccionados de N, O, o S;

Dicho proceso comprende:

(a) Proveer un complejo "ate" de boro de fórmula (IIa) o (IIb):



En donde

Y es halógeno

M⁺ e seleccionado del grupo consistente en Li⁺, Na⁺, and K⁺;

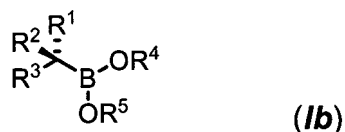
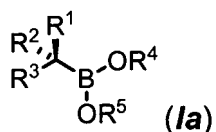
R² es hidrógeno

R³ es cloro y

R⁴ y R⁵ son como se definieron anteriormente

(b) Contactar el complejo "ate" de boro de fórmula (IIa) o (IIb) con un ácido Lewis seleccionado del grupo consistente en bromuro de zinc, cloruro

de zinc, bromuro férrico, y cloruro férrico para alcanzar el compuesto éster bórico de fórmula (Ia) or (Ib):



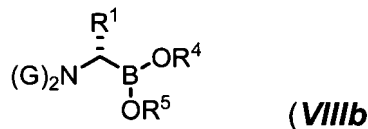
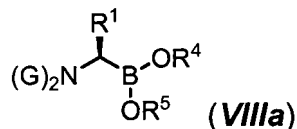
En donde cada uno de R^1 a R^5 son como se definieron anteriormente, dicha etapa de contacto se llevó a cabo en una mezcla de reacción que comprende:

Un solvente éter que tiene baja miscibilidad en agua seleccionada de grupo consistente en tert- butil metil éter, tert- butil atil éter, tert amilo metil éter, isopropil éter, y mezclas de las mismas y un co- solvente seleccionado del grupo consistente en tetrahidrofurano, dioxano, agua, y mezclas de los mismos, siempre y cuando que el co- solvente coordinado no constituya mas del 20% v/v de la mezcla de reacción;

En donde la solubilidad del agua en el solvente de éter que tiene baja miscibilidad con agua es menos del 5% p/p; y

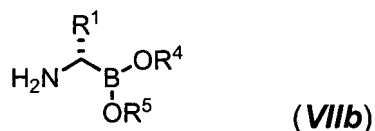
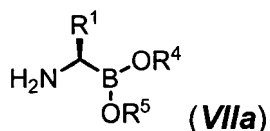
En donde el solvente de éter que tiene baja miscibilidad con agua constituye al menos el 70% v/v de la mezcla de reacción:

(c) Tratar el compuesto de éster bórico de la fórmula (Ia) o (Ib) con un reactivo de fórmula $\text{M}^1\text{-N}(\text{G})_2$, en donde M^1 es un metal alcalino y cada G es un grupo amino protegiendo un grupo funcional, para formar un compuesto de fórmula (VIIIa) o (VIIIb):



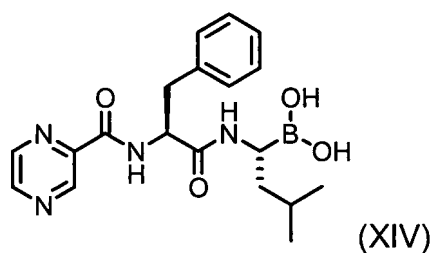
En donde cada G y R^1 to R^5 son como se definieron anteriormente; y

(d) Remover los grupos G para formar un compuesto de fórmula (VIIa) o (VIIB)



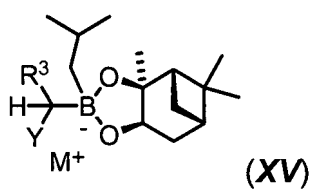
O una sal de adición ácida de la misma.

13. Un proceso para formar un compuesto de la fórmula (XIV)



o un ácido bórico anhídrido del mismo, dicho proceso comprende:

(a) Proveer un complejo (ate) de boro de fórmula (XV)



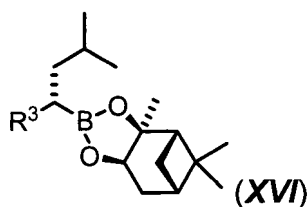
En donde

R^3 es cloro,

Y es halógeno; y

M^+ es seleccionado del grupo consistente en Li^+ , Na^+ , y K^+ ;

(b) Contactar el complejo "ate" de boro de fórmula (XV) con un ácido Lewis seleccionado del grupo consistente en bromuro de zinc, cloruro de zinc, bromuro férrico, y cloruro férrico para alcanzar el compuesto éster bórico de fórmula (XVI));

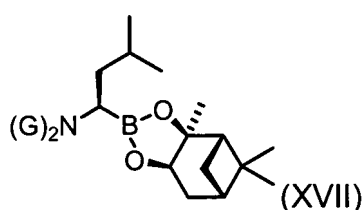


Dicho paso de contacto siendo conducido en una reacción mixta que comprende un solvente éter que tiene baja miscibilidad con agua, seleccionado del grupo consistente en tert- butilo metil éter, tert- butilo etil éter, isopropilo éter, y mezclas de los mismos i un co- solvente coordinante

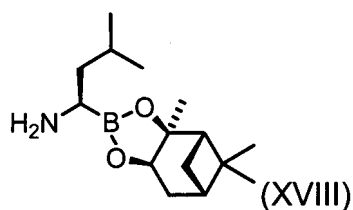
seleccionado del grupo consistente en tetrahidrofurano, dioxano, agua y mezclas de los mismos, siempre y cuando que el co- solvente coordinado no constituya más del 20% v/v de la mezcla de reacción;

en donde el solvente éter que tenga baja miscibilidad con agua constituya al menos 70% V/V de la mezcla de reacción;

(c) Tratar el compuesto de éster bórico de fórmula (XVI) con un reactivo de fórmula $M^1-N(G)_2$, en donde M^1 es un metal alcalino y cada G individualmente o en conjunto son un grupo amino grupo protector, para formar un compuesto de fórmula (XVII):

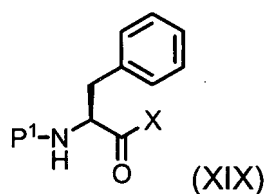


(d) Remover los grupo G para formar un compuesto de fórmula (XVIII):



O una sal de adición ácida de la misma.

(e) Unir el compuesto de la fórmula (XVIII) con un compuesto de fórmula (XIX);

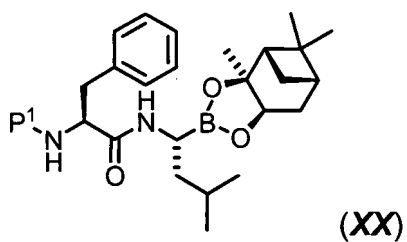


En donde:

P^1 es un grupo amino escindible protegiendo un grupo funcional; y

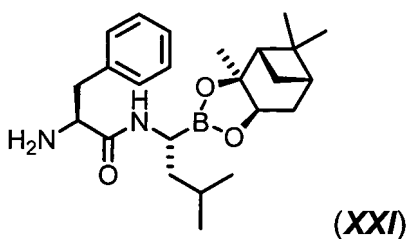
X es OH o un éster activado;

Para formar un compuesto de la fórmula (XX)



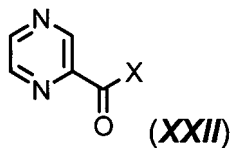
En donde P¹ es como se definió anteriormente;

- (f) Remover el grupo protector P1 para formar un compuesto de fórmula (XXI)

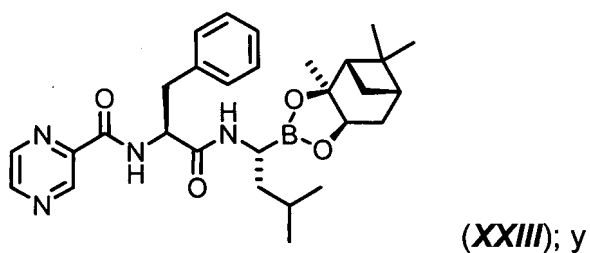


O una sal de adición ácida de la misma.

- (g) Unir el compuesto de la fórmula (XXI) con un reactivo de fórmula (XXII)



En donde X es OH o un éster activado, para formar el compuesto de fórmula (XXIII)



- (h) Desproteger el grupo funcional ácido bórico para formar el compuesto de fórmula (XIV) o un ácido bórico anhídrido del mismo que comprende los pasos:

- i. Proveer una mezcla bifásica que comprende el compuesto de fórmula (XXIII), un ácido bórico orgánico aceptante seleccionado del

grupo que consiste en ácido fenil bórico, ácido bencil bórico, ácido butilbórico, ácido isobutilbórico, ácido pentil bórico, ácido hexilbórico, y ácido ciclohexilo bórico, un alcohól inferior seleccionando del grupo consistente en metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, sec-butanol, tert- butanol un solvente hidrocarbonado C₅₋₈, y ácido mineral acuoso;

- ii. Agitar la mezcla bifásica para alcanzar el compuesto de fórmula (XIV)
- iii. Separar las capas de solvente; y
- iv. Extraer el compuesto de fórmula (XIV) o un ácido bórico anhídrido del mismo un solvente orgánico.

14. El proceso de la reivindicación 13 caracterizado por al menos una de las siguientes características (1) – (4):

1. En el complejo “ate” de boro de fórmula (XV), R³ y Y son ambos cloro
2. El paso de unión (e) comprende los pasos:
 - i. Unir el compuesto de fórmula (XVIII) con un compuesto de fórmula (XIX) en donde X es OH en la presencia de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronium tetrafluoroborato (TBTU) y una amina terciaria en dicloro metano;
 - ii. Realizar el intercambio solvente para reemplazar dicloro metano por etil acetato; y
 - iii. Realizar un lavado acuoso con solución de etil acetato;
3. El paso (f) de remoción del grupo protector comprende los pasos:
 - i. Tratar el compuesto de fórmula (XX) con HCl en acetato de etilo;
 - ii. Adicionar heptano a la mezcla de reacción; y

- iii. Aislar por cristalización el compuesto de fórmula (XXI) así como su adición de sal HCl; y
 4. El paso de unión (g) comprende los pasos
 - i. Unir el compuesto d fórmula (XXI) con ácido 2- pirazina- carboxílico en la presencia de TBTU y una amina terciaria en dicloro metano;
 - ii. Realizar el intercambio solvente para remplazar dicloro metano por etil acetato; y
 - iii. Realizar un lavado acuoso con solución de etil acetato.
- 15.El proceso de la reivindicación 14, caracterizado por todas las cuatro características (1) – (4).
- 16.El proceso de la reivindicación 14 en donde el paso (h)(iii) comprende los pasos:
 1. Separar las capas de solvente
 2. Ajustar la capa acuosa al pH básico
 3. Lavar la capa acuosa con un solvente orgánico; y
 4. Ajustar la capa acuosa a un pH menor que 8.
- 17.El proceso de la reivindicación 16 en donde en el paso ((h)(iii)(3), la capa acuosa es lavada con dicloro metano.
- 18.El proceso de la reivindicación 16 en donde en el paso (h)(iv), el compuesto de fórmula (XIV), o un ácido bórico anhídrido del mismo, es extraído en dicloro metano, el solvente es intercambiado a acetato de etilo, y el compuesto de

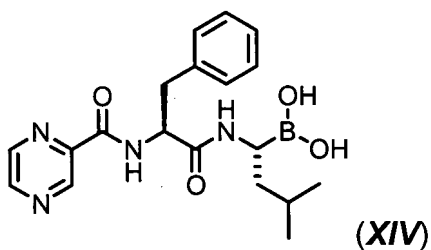
fórmula (XIV), o un ácido bórico anhídrido del mismo, es cristalizado por adición de hexano o heptano.

19. El proceso de la reivindicación 13 en donde el paso (h)(iii) comprende los pasos

1. Separar las capas de solvente
2. Ajustar la capa acuosa a pH básico
3. Lavar la capa acuosa con un solvente orgánico; y
4. Ajustar la capa acuosa a un pH menor que 8.

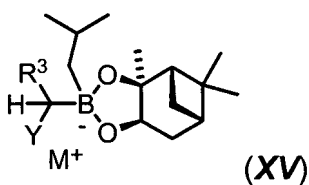
20. El proceso de la reivindicación 13, en donde el paso (h)(iv); el compuesto de fórmula (XIV), o un ácido bórico anhídrido del mismo, es extraído en dicloro metano, el solvente es intercambiado por etil acetato, un compuesto de fórmula (XIV), o un ácido bórico anhídrido del mismo, es cristalizado por adición de hexano o heptano.

21. Un proceso para formar un compuesto de fórmula (XIV);



O un ácido bórico anhídrido del mismo. El proceso comprende los pasos:

- (a) Proveer un complejo "ate" de boro de fórmula (XV)

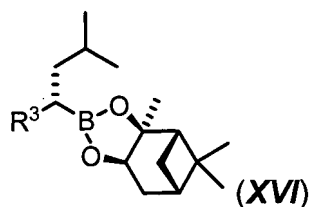


En donde R³ es cloro

Y es halógeno; y

M⁺ es seleccionado del grupo consistente en Li⁺, Na⁺, y K⁺;

(b) Contactar el complejo "ate" de boro de fórmula (XV) con un ácido Lewis seleccionado del grupo consistente en bromuro de zinc, cloruro de zinc, bromuro férrico, y cloruro férrico para alcanzar el compuesto éster bórico de fórmula (XVI):



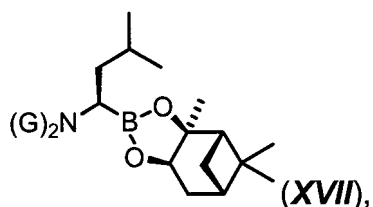
Dicho paso de contacto siendo conducido en una reacción mixta que comprende:

Un solvente éter que tiene baja miscibilidad con agua seleccionado del grupo consistente en tert-butilo metilo éter, tert-butilo etilo éter, tert-amilo metilo éter, isopropilo éter y mezclas de las mismas y un co- solvente coordinando seleccionado del grupo consistente en tetrahidrofurano, dioxano, agua y mezclas de las mismas, siempre y cuando que el co- solvente coordinado no constituya más del 20% v/v de la mezcla de reacción;

En donde la solubilidad del agua en el solvente éter que tenga menos miscibilidad con agua sea menos que 5% p/p; y

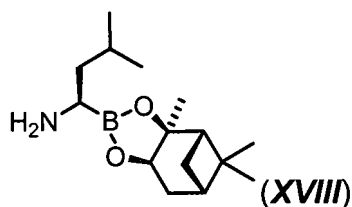
En donde el solvente éter que tiene baja miscibilidad con agua constituye al menos el 70% v/v de la mezcla de reacción.

(c) Tratar el compuesto de éster bórico de fórmula (XVI) con un reactivo de fórmula $M^1-N(Si(R^6)_3)_2$, en donde M^1 es un metal alcalino y cada R^6 independientemente es seleccionado del grupo consistente en metil, etil, propil, y butil, para formar un compuesto de fórmula (XVIII):



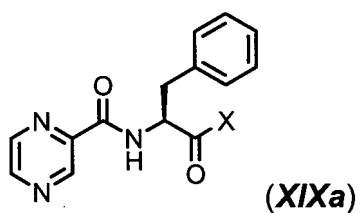
En donde G es $-\text{Si}(\text{R}^6)_3$;

(d) remover los grupos G para formar un compuesto de fórmula (XVIII)

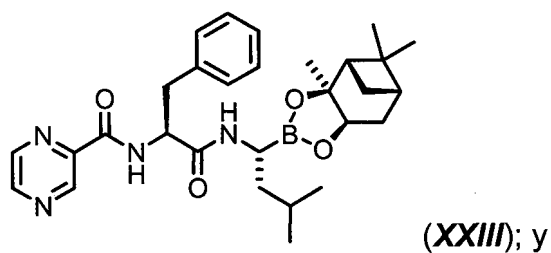


O una sal de adición ácida de la misma.

(e) Unir el compuesto de fórmula (XVIII) con el compuesto de fórmula (XIXa):



En donde C es OH o un éster activado para formar el compuesto de fórmula (XXIII):



(f) Desproteger el grupo funcional de ácido bórico para formar el compuesto de fórmula (XIV) o un ácido bórico anhídrido del mismo.

22.El proceso de la reivindicación 21, caracterizado por al menos una de las siguientes características (1) – (3):

1. En el complejo "ate" de boro de fórmula (XV) R3 y Y son ambos cloro.
2. El paso de unión (e) comprende los pasos
 - i. Unir el compuesto de fórmula (XVIII) con un compuesto de fórmula (XIXa) en donde X es OH en la presencia de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra metil uronium tetra fluoroborato (TBTU) y una amina terciaria en diclorometano;
 - ii. Realizar un intercambio solvente para remplazar el dicloro metano con acetato de etilo; y
 - iii. Realizar un lavado acuoso de la solución de acetato de etilo:
3. El paso (f) de desprotección de ácido bórico comprende los paso:
 - i. Proveer una mezcla bi fásica que comprende el compuesto de fórmula (XIII), un ácido bórico orgánico aceptante seleccionado del grupo que consiste en ácido fenil bórico, ácido bencil bórico, ácido butilbórico, ácido isobutilbórico, ácido pentilbórico, ácido hexilbórico, y ácido ciclohexilo bórico, un alcanól inferior seleccioando del grupo consistente en metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, sec-butanol, tert- butanol un solvente hidrocarbonado C5 8, y ácido mineral acuoso;
 - ii. Agitando la mezcla bi fásica para alcanzar el compuesto de fórmula (XIV)
 - iii. Separar las capas de solvente; y
 - iv. Extraer el compuesto de fórmula (XIV) o un ácido bórico anhídrido del mismo un solvente orgánico

23.El proceso de la reivindicación 22 en donde el paso (f)(iii) comprende los pasos

1. Separar las capas de solvente
2. Ajustar la capa acuosa a pH básico
3. Lavar la capa acuosa con un solvente orgánico; y
4. Ajustar la capa acuosa a un pH menor que 8.

24. El proceso de la reivindicación 23 en donde en el paso (f')(iii)(3), la capa acuosa es lavada con dicloro metano.

25. El proceso de la reivindicación 23, en donde en el paso (f')(iv), el compuesto de fórmula (XIV), o un ácido bórico anhídrido del mismo, es extraído en dicloro metano, el solvente es intercambiado a acetato de etilo, y el compuesto de fórmula (XIV), o un ácido bórico anhídrido del mismo, es cristalizado por adición de hexano o heptano.

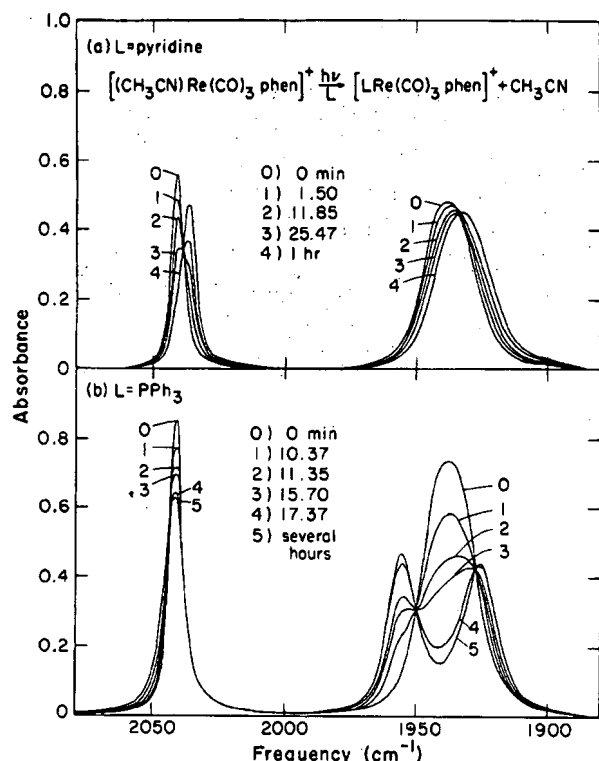


Figure 2. Infrared spectral changes accompanying light-induced formation of $[\text{LRe}(\text{CO})_3\text{phen}]^+$ from $[(\text{CH}_3\text{CN})\text{Re}(\text{CO})_3\text{phen}]^+$ for (a) $\text{L} = \text{pyridine}$ and (b) $\text{L} = \text{PPh}_3$.

relevance in imaging, since many metal complexes undergo significant optical spectral changes upon ligand substitution.

Acknowledgment. We thank the National Science Foundation for support of this research.

(*R*)-1-Acetamido-2-phenylethaneboronic Acid. A Specific Transition-State Analogue for Chymotrypsin

Donald S. Matteson* and Kizhakethil M. Sadhu

Department of Chemistry, Washington State University
Pullman, Washington 99164

Gustav E. Lienhard*

Department of Biochemistry, Dartmouth Medical School
Hanover, New Hampshire 03755

Received March 30, 1981

We report the synthesis of (*R*)-1-acetamido-2-phenylethaneboronic acid (**5a**), the boronic acid analogue of *N*-acetyl-L-phenylalanine, by the unambiguous route outlined in Scheme I, and its potent competitive inhibition of chymotrypsin, with a dissociation constant of 2.1×10^{-6} M at 25.0 °C and pH 7.5.

Aryl and arylalkylboronic acids bind strongly to the serine proteases chymotrypsin^{1,2} and subtilisin.^{2,3} The reason for this affinity is that the boronic acid group reversibly forms a tetrahedral adduct with the active site serine hydroxyl group, and the adduct crudely resembles the transition state for ester or amide hy-

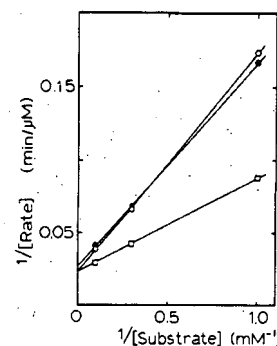
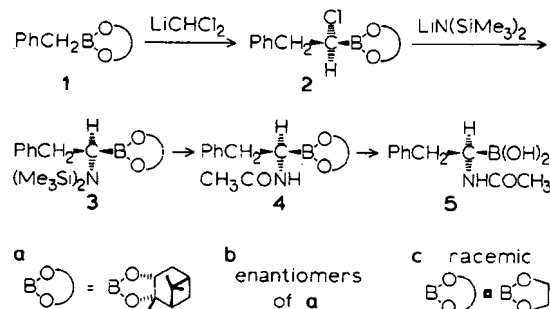


Figure 1. Inhibition of the chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of methyl hippurate at pH 7.5 and 25.0 °C by 4×10^{-6} M (*R*)-1-acetamido-2-phenylethaneboronic acid (**5a**) (●) and 5×10^{-5} M *S* enantiomer (**5b**) (○). (□) Values obtained without inhibitor. The concentration of chymotrypsin, determined by active site titration of the stock solution,²³ was 2.8×10^{-6} M in each assay. The details of the assay are given in ref 1. Each rate of hydrolysis was constant for at least 5 min after initiation. The points give the averages of duplicate determinations, which agreed to within $\pm 5\%$.

Scheme I



drolysis.^{2,4} It was anticipated that boronic acids corresponding to the specific amino acid substrates for these proteases would be even more potent inhibitors than the compounds tested to date, which only partially satisfy the specificity requirements of the enzymes. Previous attempts to synthesize α -amino or α -amido boronic acids have been unsuccessful, except for the alkylated amino series $\text{R}_2\text{NCH}_2\text{B}(\text{OR})_2$ and $\text{R}_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{B}(\text{OR})_2$.^{5,6} Esters and amides of *N*-acetyl-L-phenylalanine are specific substrates for chymotrypsin,⁷ and the compound described herein provides the first example of a transition-state analogue of the boronic acid type corresponding to a specific substrate for a serine protease.

The recently reported homologation of ethylene glycol benzylboronate (**1c**) by (dichloromethyl)lithium to yield the 1-chloro-2-phenylethaneboronate (**2c**)⁸ made this material easily available. The key to completion of the synthesis was the reaction of **2c** with lithiohexamethyldisilazane, which yielded 85% of the silylated amino boronic ester **3c**, a stable, distillable liquid that

(4) (a) Matthews, D. A.; Alden, R. A.; Birktoft, J. J.; Freer, S. T.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 7120-7126. (b) Robillard, G.; Shulman, R. G. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 541-558.

(5) Lindquist, R. N.; Nguyen, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6435-6437 reported the preparation of benzamidomethaneboronic acid and its inhibition of chymotrypsin. However, it now appears likely that the compound obtained by them was an isomer, $\text{PhC}(\text{=NH})\text{OCH}_2\text{B}(\text{OH})_2$ (probably with B-N chelation), from O-alkylation of the amide anion by the α -halo boronic ester, which has been observed by D.S.M. in analogous reactions. Their compound did not exhibit the expected pK of ~ 9 upon potentiometric titration.

(6) (a) Matteson, D. S.; Cheng, T. C. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3055-3060. (b) Matteson, D. S.; Jesthi, P. K. *J. Organomet. Chem.* **1976**, *114*, 1-7. (c) Matteson, D. S.; Majumdar, D. *Ibid.* **1979**, *170*, 259-264. (d) Matteson and Arne (Matteson, D. S.; Arne, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1325-1326) reported $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{BO}_2\text{C}_2(\text{CH}_3)_4)$, which with ammonia yields 2-phenylethylamine. Matteson, D. S., unpublished.

(7) (a) Blow, D. M. *Enzymes*, 3rd Ed. **1971**, *3*, 185-212. (b) Hess, G. P. *Ibid.* **1971**, *3*, 213-248.

(8) Matteson, D. S.; Majumdar, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7588-7590.

(1) (a) Koehler, K. A.; Lienhard, G. E. *Biochemistry* **1971**, *10*, 2477-2483. (b) Rawn, J. D.; Lienhard, G. E. *Ibid.* **1974**, *13*, 3124-3130. (2) Philipp, M.; Bender, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1971**, *68*, 478-480. (3) Lindquist, R. N.; Terry, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *160*, 135-144.

was fully characterized.^{9,10} Precedent could be cited for expecting dehydrohalogenation of **2c** by hindered base,¹¹ but there are other precedents for boron-assisted displacements by highly hindered nucleophiles.^{8,11,12}

Desilylation of **3c** with methanol gave impure ethylene glycol 1-amino-2-phenylethaneboronate, $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{BO}_2\text{C}_2\text{H}_4$, unstable to distillation.¹³ Its isolation was bypassed by treating **3c** with acetic anhydride and acetic acid, which yielded 86% ethylene glycol 1-acetamido-2-phenylethaneboronate (**4c**),^{10,14} a distillable solid, too water soluble to be extracted into ether.

The directed chiral synthesis of pinanediol α -chloro boronic esters¹⁵ was used to make the separate enantiomers of 1-acetamido-2-phenylethaneboronic acid (**5a** and **5b**). Optically pure (+)-pinanediol benzylboronate (**1a**)^{10,16} was homologated with (dichloromethyl)lithium¹⁵ to **2a**, which was treated in situ with lithiohexamethyldisilazane followed by acetic anhydride and acetic acid to yield (+)-pinanediol (*R*)-1-acetamido-2-phenylethaneboronate (**4a**), 63% isolated by chromatography, recrystallized from dichloromethane to constant rotation.^{10,17} Destructive cleavage of the pinanediol ester with boron trichloride¹⁵ yielded (*R*)-1-acetamido-2-phenylethaneboronic acid (**5a**), which was characterized as its reversibly formed boronic anhydride.^{10,18} The *S* enantiomers were similarly prepared.¹⁹

The affinity of chymotrypsin for the *R* and *S* isomers of 1-acetamido-2-phenylethaneboronic acid (**5a** and **5b**) was determined by examining the effects of these compounds on the rates of hydrolysis of methyl hippurate.¹ The reciprocal plots of initial velocity against substrate concentration given in Figure 1 show the pattern characteristic of competitive inhibition.²⁰ The competitive nature of the inhibition indicates that the compounds bind at the active site. The values of the dissociation constants, which were obtained from the data by standard equations,^{20,21} are 2.1×10^{-6} M for the *R* isomer (**5a**) and 5.3×10^{-5} M (or greater if optical purity < 100%) for the *S* isomer (**5b**). The dissociation constant for 2-phenylethaneboronic acid, which lacks the acetamido substituent, was previously found to be 4×10^{-5} M.¹ The

fact that (*R*)-1-acetamido-2-phenylethaneboronic acid (**5a**) binds the most tightly agrees with expectations¹ based upon the properties of the corresponding carbon compounds: L-phenylalanine derivatives are hydrolyzed by chymotrypsin much more rapidly than are 3-phenylpropionic acid and D-phenylalanine derivatives, although the three classes bind to the enzyme with about the same strength.^{7,22} The affinity of chymotrypsin for the (*R*)-boronic acid **5a** is about 14 000 times greater than that for *N*-acetyl-L-phenylalanine amide.⁷

Acknowledgment. D.S.M. thanks the National Institutes of Health for financial support (Grant GM-27109).²⁴

(22) Ingles, D. W.; Knowles, J. R. *Biochem. J.* 1968, 108, 561-569.

(23) Keady, F. J.; Clement, G. E.; Bender, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 3690-3696.

(24) After completing this work, we learned of the interest of Dr. Manfred Philipp in boronic acids as enzyme inhibitors and sent him a sample of **5a**. He has found **5a** to be a competitive inhibitor of subtilisin, $k_i(\text{lim}) = 1.7 \times 10^{-6}$ M. We thank Dr. Philipp for informing us of these results: Philipp, M.; Sreenivasulu, M., manuscript submitted for publication.

Flavoprotein Monooxygenases: A Chemical Model

John W. Frost and William H. Rastetter*[†]

Department of Chemistry
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, Massachusetts 02139

Received May 4, 1981

Among the metabolic functions of the flavin-dependent monooxygenases² is the ortho hydroxylation of phenolic substrates such as salicylate and *p*-hydroxybenzoate. The unique position of the flavoproteins among biological hydroxylases follows from the reactivity of the metal-free, reduced isoaalloxazine (dihydroflavin) nucleus with molecular oxygen. Evidence points to a subsequently formed 4α -hydroperoxide (**10**, Scheme II) as the molecular species responsible for, or leading to, flavin monooxygenase activity.³ Herein we present a chemical model which suggests a flavin-based nitroxyl radical as the hydroxylating agent in the flavin monooxygenase ortho hydroxylation of phenolic substrates. Possible *in vivo* routes from the putative 4α -(hydroperoxy)flavin to an *N*⁵-nitroxyl radical are discussed.

The flavin model work of Bruice et al.^{4,5} has demonstrated the extremely facile oxidation of sulfides and amines and the di-oxygenation of phenolate anions by 5-ethyl-3-methyl- 4α -(hydroperoxy)lumiflavin. However, no flavin monooxygenase model system has adequately explained flavin-mediated hydroxylation of phenols.⁶ Our earlier work⁷ with flavin *N*⁵-oxide **1a** (Scheme I) showed the photolytic transfer of the *N*⁵-oxygen

(1) Alfred P. Sloan Fellow, 1980-1982.

(2) (a) Walsh, C. *Acc. Chem. Res.* 1980, 13, 148. (b) Massey, V.; Hemmerich, P. *Enzymes*, 3rd Ed. 1976, 12, 191. (c) Hemmerich, P. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 1976, 33, 451. (d) Dagley, S. In "Essays in Biochemistry", Campbell, P. N., Aldridge, W. N., Eds.; Academic Press: New York, 1975; Vol. 11, p 81. (e) Flashner, M. S.; Massey, V. In "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", Hayaishi, O., Ed.; Academic Press: New York, 1974; p 245.

(3) (a) Spector, T.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 7123. (b) Strickland, S.; Massey, V. *Ibid.* 1973, 248, 2953. (c) Entsch, B.; Massey, V.; Ballou, D. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974, 57, 1018. (d) Entsch, B.; Ballou, D. P.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* 1976, 251, 2550. (e) Kemal, C.; Bruice, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1976, 73, 995. (f) Presswood, R.; Kamin, H. In "Flavins and Flavoproteins, Proceedings of the Fifth International Symposium", Singer, T. P., Ed.; Elsevier: New York, 1976; p 145. (g) Ghisha, S.; Entsch, B.; Massey, V.; Husein, M. *Eur. J. Biochem.* 1977, 76, 139.

(4) (a) Ball, S.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 4017. (b) *Ibid.* 1980, 102, 6498.

(5) (a) Kemal, C.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 1635. (b) Bruice, T. C.; Muto, S. *Ibid.* 1980, 102, 4472. (c) Iwata, M.; Bruice, T. C.; Carrell, H. L.; Glusker, J. P. *Ibid.* 1980, 102, 5036.

(6) Bruice has suggested that flavoprotein monooxygenase activity may be explained by initial dioxygenation of phenolic substrates.^{5a}

(7) Rastetter, W. H.; Gadek, T. R.; Tane, J. R.; Frost, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 2228.

(9) One equivalent of **2c** was added to $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ in THF at -78°C , the mixture kept overnight at 20°C , and the product distilled from LiCl; bp $103-104^\circ\text{C}$ (0.03 torr), $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.15 (s, 18, SiCH_3), 2.95 (m, 3, CH_2CH), 4.23 (s, 4, OCH_3), 7.40 (s, 5, C_6H_5).

(10) Satisfactory analyses ($\pm 0.3\%$) were obtained for all elements except oxygen.

(11) (a) Matteson, D. S.; Mah, R. W. *H. J. Org. Chem.* 1963, 28, 2174-2176. (b) Reaction of $\text{PhCH}_2\text{CHIBO}_2\text{C}_2(\text{CH}_3)_4$ with $\text{LiN}(\text{COCH}_3)_2$ yielded $\text{PhCH}=\text{CHBO}_2\text{C}_2(\text{CH}_3)_4$. Matteson, D. S., unpublished.

(12) Brown, H. C.; De Lue, N. R.; Yamamoto, Y.; Maruyama, K.; Kasahara, T.; Murahashi, S.; Sonoda, A. *J. Org. Chem.* 1977, 42, 4088-4092.

(13) Treatment of **3c** with methanol at 0°C followed by vacuum concentration and washing the residue with ether gave impure $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{BO}_2\text{C}_2\text{H}_4$, mp $143-149^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ in $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ showed a single CH_2CH peak at δ 3.1, distinctly different from the multiplet of added $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

(14) A THF solution of **3c** at -78°C was treated with 3 equiv of acetic anhydride and 1 equiv of acetic acid, kept at 20°C for 15 h, and distilled; bp $143-145^\circ\text{C}$ (0.03 torr), resublimed, mp 128°C ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.04 (s, 3, COCH_3), 2.75 (m, 3, CH_2CH , resolved to doublet and triplet by Eu(fod)₃), 3.90 (s, 4, OCH_3), 7.40 (s, 5, C_6H_5), 7.10, concentration dependent (br s, 1, *NH*); $^{13}\text{C NMR}$ consistent with assigned structure.

(15) Matteson, D. S.; Ray, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 7590-7591.

(16) Bp 108°C (0.1 torr); $[\alpha]_D^{25} + 31.30^\circ$ (c 18, toluene); $^1\text{H NMR}$ consistent with assigned structure.

(17) Eluted from silica gel with ether, recrystallized three times (CH_2Cl_2), mp $185-186^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -82.4^\circ$ (c 3-5, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.8-2.5 (m, 18, pinane + COCH_3), 2.9 (m, 3, CHCH_2), 4.32 (m, 1, OCH), 7.36 (s, 5, C_6H_5); $^{13}\text{C NMR}$ consistent with assigned structure.

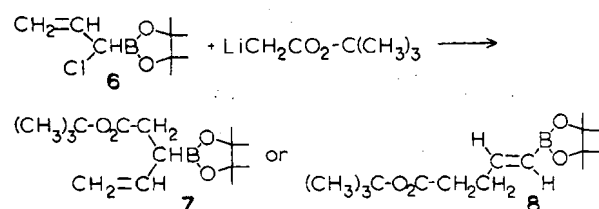
(18) The mixture was concentrated under vacuum and the residue was washed with ether, treated with methanol, concentrated, dissolved in water, and neutralized with Dowex 1-X8 ion exchange resin bicarbonate, concentrated, and crystallized from THF/water, 80-85%; $[\alpha]_D^{25} -196^\circ$ (c 0.6, H_2O) for the boronic anhydride; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 2.20 (s, 3, COCH_3), 2.82 (m, 3, CH_2CH), 5.2 (s, ~2.5, $\text{OH} + \text{NH}$), 7.40 (s, 5, C_6H_5); $^{13}\text{C NMR}$ (D_2O) δ 176.36 (COCH_3), 140.57, 128.68 (2), 128.55 (2), 128.55 (2), 126.21 (C_6H_5); 49.56 (br, CHNB); 36.18 (PhCH_2); 16.11 (COCH_3). Potentiometric titration showed 1 mol of boronic acid, $\text{pK} = 8.85$.

(19) **4b**: $[\alpha]_D^{25} + 83.3^\circ$ (c 3, CHCl_3). **5b**: $[\alpha]_D^{25} + 195^\circ$ (c 0.7, H_2O) for sample of composition $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{BNO}_2 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$.¹⁰

(20) Dixon, M.; Webb, E. C. "Enzymes", 3rd ed.; Academic Press: New York, 1979; pp 332-381.

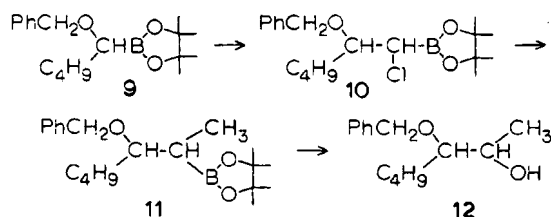
(21) In the case of the *R* isomer, eq VIII.89 of ref 20 was used, since significant fractions of the added inhibitor (20-35%) are bound to the enzyme.

© 1980 American Chemical Society



of **7** was confirmed by the vinyl pattern in the NMR at δ 5.1 (m, 2, =CH₂) and 5.9 (m, 1, =CH). When excess LDA was used in the preparation of the lithioacetate, up to 65% of the product was **8**, perhaps produced by O-alkylation and Cope rearrangement. The two products were readily separable by distillation, and the structure of **8** was confirmed by the characteristic *trans*-alkene-boronic ester pattern¹⁵ in the NMR at σ 5.55 (d, J = 19 Hz, =CHB) and 6.66 (m, HC=CB). Structures **7** and **8** were further confirmed by resolution with the shift reagent Eu(fod)₃.

Homologation of pinacol 1-(benzyloxy)pentane-1-boronate (**9**) (method A) followed by treatment of the crude α -chloro- β -(benzyloxy)alkaneboronic ester **10** with methylmagnesium bromide yielded the β -benzyloxy boronic ester **11**. Both **10** and **11** were unstable to distillation, partially decomposing by boron-oxygen β elimination, but oxidation of crude **11** with alkaline sodium perborate¹⁶ yielded 3-(benzyloxy)-2-heptanol (**12**), 71% based on **9**.



The utility of these reactions in synthesis is limited by the formation of mixtures of diastereoisomers. Chiral control of the homologation process is described in the following communication.¹⁷

Acknowledgment. We thank the National Science Foundation for support (Grant No. CHE 77-11283).

- (15) Matteson, D. S.; Jesthi, P. K. *J. Organomet. Chem.* **1976**, *110*, 25-37.
 (16) Matteson, D. S.; Moody, R. J. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1091-5.
 (17) Matteson, D. S.; Ray, R. *J. Am. Chem. Soc.*, following paper in this issue.

Donald S. Matteson,* Debesh Majumdar

Department of Chemistry
 Washington State University
 Pullman, Washington 99164

Received August 4, 1980

Directed Chiral Synthesis with Pinanediol Boronic Esters

Sir:

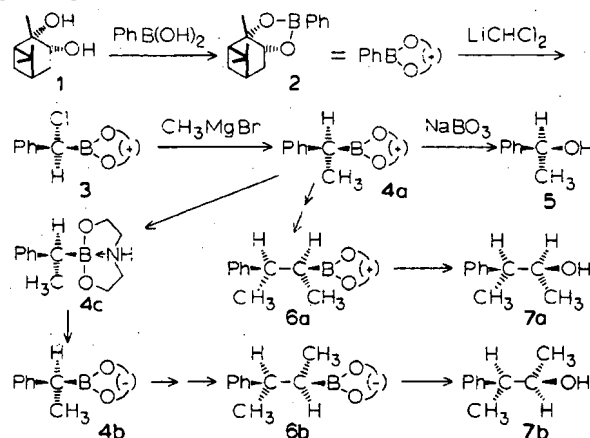
The efficient homologation of boronic esters to α -chloro boronic esters reported in the preceding communication¹ and the availability of (+)-pinanediol² (**1**) from (+)- α -pinene,³ as well as the enantiomer from (-)- α -pinene, by our osmium tetroxide catalyzed

(1) Matteson, D. S.; Majumdar, D. *J. Am. Chem. Soc.*, preceding paper in this issue.

(2) The rotation is low, $[\alpha]_D +3.3^\circ$; Schmidt, H. *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2485-90.

(3) Absolute configuration: Brewster, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5483-93. Commercial (+)- α -pinene, 92% ee, and (-)- α -pinene, 82% ee, were used.

Scheme 1



hydroxylation⁴ provide the basis for a promising new approach to directed chiral synthesis. To demonstrate, we have synthesized the known⁵ (2*S*,3*S*)-3-phenyl-2-butanol (**7a**) (erythro isomer) and (2*R*,3*S*)-3-phenyl-2-butanol (**7b**) (threo isomer) from optically pure (+)-pinanediol benzeneboronate (**2**) by double homologation and subsidiary transformations. Diastereoselectivities achieved were 97% ($\pm$ 1%) in the first homologation and 92-95% in the second homologations leading to **7a** and **7b**.

Semiquantitative exploratory experiments, summarized briefly in the final paragraph, established that homologation of boronic esters of (+)-pinanediol with (dichloromethyl)lithium yields α -chloro boronic esters but that prolonged exposure of these products to the chloride ion produced in the reaction may result in significant epimerization. Crystallization of the complex salt of (+)-pinanediol (**1**) with basic sodium borate was observed, which leads to enantiomerically pure **1** on regeneration with cold dilute acid.⁷ On the basis of these results, the following efficient syntheses of **7a** and **7b** were designed directly.

(+)-Pinanediol benzeneboronate^{6,8} (**2**) was added to (dichloromethyl)lithium¹ at -100°C and the mixture was kept at 0°C for 1 h, cooled to -78°C , treated with methylmagnesium bromide, and kept at 20°C overnight.⁹ The resulting (+)-pinanediol (*S*)-1-phenylethaneboronate (**4a**) (94%) was found to contain 96.8% ($\pm$ 1%) *S* isomer, as estimated by oxidation with alkaline sodium perborate¹⁰ to (*S*)-1-phenylethanol¹¹ (**5**) (100%), which was converted to the acetate ester for precise measurement of optical rotation,^{12,13} enantiomeric excess (ee) 93.7%. The absolute configurations of the boronic esters **3** and **4a** are assigned

(4) Ray, R.; Matteson, D. S. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 449-50.

(5) Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3863-70, 3883-9.

(6) $[\alpha]_D^{25} +17.9^\circ$ (8%, benzene).

(7) Crystallizes as $(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2)_2\text{B}^-\text{Na}^+\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ from THF/water, recrystallized from 95% ethanol/2-propanol. Treatment with 1 equiv of dilute hydrochloric acid, extraction with several portions of petroleum ether, and distillation regenerates **1**, contaminated with varying amounts of its boric acid ester, which does not interfere with synthetic use. Optical purity was determined on the derived benzeneboronate ester **2**.

(8) New compounds were characterized by ¹H NMR and satisfactory analyses ($\pm$ 0.4%) were obtained for all elements except oxygen, except for α -chloro boronic esters (**10**), of which only the homologation product from **4a** has been analyzed satisfactorily to date.

(9) Stoichiometric amounts of reactants were used, with 60 mL of THF solvent for 24 mmol. The product was worked up with aqueous acid, extraction with ether, and Kugelrohr distillation at 130 - 135°C (0.1 torr); purity was confirmed by ¹H NMR.

(10) Matteson, D. S.; Moody, R. J. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1091-5. Sufficient conditions for these hindered boronic esters, 1 M in 1:1 THF/water, included 5-10% excess sodium perborate, 0.5 equiv of sodium hydroxide, and 15 h at 25°C . Most samples were refluxed. On addition of petroleum ether, sodium pinanediol borate crystallized, and the other alcohol was purified by extraction and Kugelrohr distillation.

(11) Jacques, J.; Gros, C.; Bourcier, S. "Stereochemistry"; Kagan, H. B., Ed.; Georg Thieme: Stuttgart, 1977; Vol. 4.

(12) Obsd $[\alpha]_D^{25} -116.7^\circ$ (3%, benzene) (lit.¹³ $[\alpha]_D^{25} -124.5^\circ$).

(13) Huisgen, R.; Rüchardt, C. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1966**, *601*, 21-34.

Table I. Conversion of Boronic Esters (1) to Homologous α -Chloro Boronic Esters (3)

RBO ₂ C ₂ R' (1)			RCHCIBO ₂ C ₂ R' (3)			
R	R'	ref or bp ^b	method ^a	yield, %	bp, °C (torr)	NMR, CHCl ₃ , δ^c
CH ₃ (CH ₂) ₃	H	12a	A	80	75–79 (4)	3.43
CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃	12b	B	86	50–51 (0.06)	3.50
(C ₂ H ₅) ₂ (CH ₃)CH	H	37–38 (12)	A	77	88–90 (5)	3.52, 3.60 ^d
(CH ₃) ₃ C	H	28–30 (12)	A	78 ^e	61–62 (2)	3.37
<i>o</i> -C ₆ H ₅	H	57–58 (5)	A	82	83–85 (1)	3.50
<i>o</i> -C ₆ H ₁₁	H	12c	A	86	87–89 (0.25)	3.26
CH ₂ =CH	CH ₃	34–37 (7)	A ^f	90	67–70 (2)	4.07
CH ₂ =CHCH ₃	CH ₃	50–53 (5)	A	87	50–52 (0.3)	3.39
C ₆ H ₅ CH ₂	H	12d	A	84	90–94 (0.15)	3.50
4 ^a		60 (0.03)	A ^{a,g}	86	93–94 (0.06)	3.55
5 ^a		95 (0.03)	A ^{a,g}	67	119–121 (0.03)	3.98
7 ^a		67–70 (0.07)	B	84	99–101 (0.05)	3.42, 3.68 ^d
9 ^a		109–111 (0.07)	B	81 ^h	100–140 (0.2) ^h	3.60, 3.66 ^d

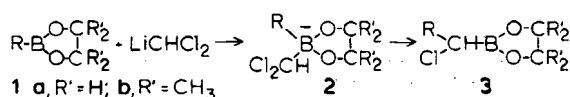
^a See text. ^b °C (torr), analytical sample. ^c Splittings in accord with assigned structures, line widths 2–4 Hz. ^d Diastereoisomers. ^e Contained a few percent impurity not removed by distillation; hydrolyzed to boronic acid and reesterified for analytical sample. ^f Scale was 0.1 mol. Method B gave only 47%. ^g Heated to completion. ^h Impure because of partial decomposition during distillation. Volatile decomposition products were partially removed from the distilled sample by molecular distillation, 50–65 °C (0.01 torr). Anal. C, H, B; Cl, calcd 10.05, found 9.21.

Table II. Reactions of α -Chloro Boronic Esters (3) with Nucleophiles

RCHCIBO ₂ C ₂ R' (3)		product			
R	R'	nucleophile	structure	bp, °C (torr)	yield, %
<i>o</i> -C ₆ H ₅	H	NaSPh	C ₆ H ₅ CH(SPh)BO ₂ C ₂ H ₄	120–124 (0.2)	91
(CH ₃) ₃ C	H	NaSPh	(CH ₃) ₃ CCH(SPh)BO ₂ C ₂ H ₄ ^a	105–110 (0.15)	88
<i>o</i> -C ₆ H ₅	H	PhMgBr	C ₆ H ₅ CH(Ph)BO ₂ C ₂ H ₄	90–93 (0.1)	90
<i>o</i> -C ₆ H ₅	H	<i>n</i> -C ₆ H ₅ Li	C ₆ H ₅ CH(C ₆ H ₅)BO ₂ C ₂ H ₄	85–89 (2.8)	92
<i>o</i> -C ₆ H ₅	H	<i>o</i> -C ₆ H ₁₁ MgCl	C ₆ H ₅ CH(C ₆ H ₁₁)BO ₂ C ₂ H ₄	85–88 (0.1)	94
<i>n</i> -C ₆ H ₅	CH ₃	LiOCH ₂ Ph	9 ^b	109–111 (0.07)	93
CH ₂ =CH (6)	CH ₃	<i>t</i> -BuO ₂ CCH ₂ Li ^c	7 ^b	67–70 (0.07)	80
CH ₂ =CH (6)	CH ₃	<i>t</i> -BuO ₂ CCH ₂ Li ^d	8 ^b (and 7 ^e)	82–83 (0.05)	40 ^e
10 ^b		CH ₃ MgBr	12 ^b	85–90 (0.07)	71 ^{b,f}

^a Anal. H, B, S; C, calcd 62.42, found 63.14. ^b See text. ^c Made with excess *t*-BuOAc. ^d Made with excess LDA. ^e Yield of 7, 22%, total 62%, by NMR analysis of once-distilled product. ^f Overall yield from 9.

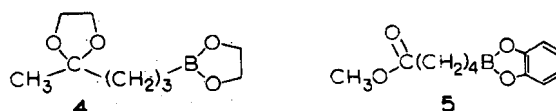
Boronic esters 1 have been homologated with [(trimethylsilyl)chloromethyl]lithium,⁶ and there is precedent for the rearrangement of dichloromethaneboronates 2 to α -chloro boronic esters 3 in the reported use of diisopropyl dichloromethaneboronate to homologate RLi to RCHO.⁵



We have now found that boronic esters 1 react rapidly with (dichloromethyl)lithium at –100 °C (method A)⁷ to form 2, which rearrange at 20 °C or above to the α -chloro boronic esters 3 in high yields (Table I).⁸ The products 3 may be further converted to more complex or functionalized boronic esters 1 (Table II), with the inherent possibility of repeated homologation and structural elaboration. The homologation process tolerates carboxylic ester substituents, though ketones have to be protected. β -Alkoxy boronic esters have been found stable enough toward boron-oxygen β elimination to permit use in synthesis. (Dichloromethyl)lithium generated in situ⁹ at –78 °C homologates

pinacol boronic esters 1b (method B).¹⁰

Unfunctionalized boronic esters 1 as well as the ketal 4 were derived from Grignard reagents.^{11,12} Pinacol boronic esters 1b are stable to water and oxygen. Catecholborane¹³ hydroborated methyl 4-pentenoate to 5.



The other functionalized boronic esters were obtained from reactions of α -chloro boronic esters 3 with nucleophiles (Table II).¹⁴ Pinacol 3-chloro-1-propene-3-boronate (6) gave two products with *tert*-butyl lithioacetate. The simple C-alkylation product 7 was produced exclusively in high yield whenever excess *tert*-butyl acetate was present, regardless of whether the solvent was hexane or THF or contained triglyme and whether the *tert*-butyl lithioacetate was in solution or suspension. The structure

(10) Lithium diisopropylamide (LDA) (12 mmol) in hexane was fluidized with a little THF and added dropwise to 1b (10 mmol) and dichloromethane (1 mL) in dimethoxyethane (10 mL) at –78 °C. After 1–2 h at 20 °C, the product was distilled.

(11) Boronic acids: Washburn, R. M.; Levens, E.; Albright, C. F.; Billig, F. A. "Organic Syntheses"; Wiley, New York, 1963; Collect. Vol. IV, pp 68–72. Esterification with ethylene glycol or pinacol hydrate to form 1 was conveniently accomplished by stirring the reactants with ether until dissolved, adding hexane to aid separation of water and any excess diol, and distilling.

(12) Known 1: (a) Laurent, J. P. C. R. *Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. C* 1962, 254, 866–8. (b) Mendoza, A.; Matteson, D. S. *J. Org. Chem.* 1979, 44, 1352–4. (c) Tokuda, M.; Chung, V. V.; Inagaki, K.; Itoh, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1977, 690–1. (d) Korcek, S.; Watts, G. B.; Ingold, K. U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1972, 242–8.

(13) Brown, H. C.; Gupta, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 1816–8.

(14) The reactants were mixed in THF at –78 °C and the mixture was kept at 20 °C overnight, filtered (Li or Na salts) or given aqueous workup (Mg salts), and distilled. Preparation of 9 was preferably carried out in 1,2-dimethoxyethane, with brief reflux to ensure completion.

(6) Matteson, D. S.; Majumdar, D. J. *Organomet. Chem.* 1980, 184, C41–C43.

(7) (Dichloromethyl)lithium was prepared by Rathke's procedure,⁵ modified so that the butyllithium was chilled before mixing, either by running it down the inside of the cold flask or by having the syringe needle tip within 5 mm of the cold liquid. Addition time was 5–10 min for 10–100 mmol. The precipitate of LiCHCl₂ dissolved immediately on injection of the boronic ester (~0.9 equiv). The solution was kept at 20 °C overnight, treated with dichloromethane or hexane to precipitate lithium chloride, filtered, and distilled. Rearrangement of intermediates 2 from 4 and 5 required melting the 2 (80–100 °C) under vacuum, and the 2 and 9 were refluxed 10 min in THF to ensure completion.

(8) All new compounds were characterized by ¹H NMR and acceptable analyses ($\pm 0.4\%$) for all elements except oxygen, except as noted.

(9) Corey, E. J.; Jautelat, M.; Oppolzer, W. *Tetrahedron Lett.* 1967, 2325–8.