

01



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06-52852

**TITULO: PROCEDIMIENTOS PARA PREPARA AMINAS ENRIQUECIDAS
ESTEREOISOMÉRICAMENTE.**

SOLICITANTE: PFIZER INC.

IPC: C07D 29/00 ; A61 K 31/00 21/195

DIRECCIÓN: 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Junio 1 de 2006

OLARTE RAISBECK



06179
EL SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-052852-00000-0000
Fec: 2006-06-01 17:08:39 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tm. 11 PATENTE/II
Evs: 379 FASE NACIONAL II
Act 411 PRESENTACION
Folios: 136

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: PFIZER INCDirección: 235 East 42nd Street, New York, NY
10017 E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: (1) SHANGHUI HU; (2) CARLOS ALBERTO MARTÍNEZ ;
(3) JUNHUA TAO; (4) DANIEL RIDA YAZBECKDirección: (1, 2, 3 y 4) 10777 Science Center Drive, San Diego, California
92121, E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: (1 y 3) CHINO; (2) COLOMBIANO; (4)
ESTADOUNIDENSE

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/003812Fecha Noviembre 22, 2004Publicación Internacional No. WO 2005/054186Fecha Junio 16, 2005

6

Título (54) PROCEDIMIENTOS PARA PREPARA AMINAS ENRIQUECIDAS
ESTEREOISOMÉRICAMENTE.Clasificación Internacional (51) C07D 207/00; A61K31/15Prioridad
SI ☒ N ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Diciembre 4, 2003

(31) Número de Solicitud

60/527143

7

Comprobante de pago No. 06 - 41,021Fecha Junio 1, 2006

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☒

Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☒

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

9³

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-052852- -00000-0000
Fec: 2006-06-01 17:08:59 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trz. 11 PATENTEIYI
Ere: 379 FASENACIONALI
Acl: 411 PRESENTACION Folios: 100

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 41,021
FECHA : JUNIO 1 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEER	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52332391	31/05/2006	3,738,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
PFIZER INC.**

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman
Sello Notario Público en alto relieve rojo.

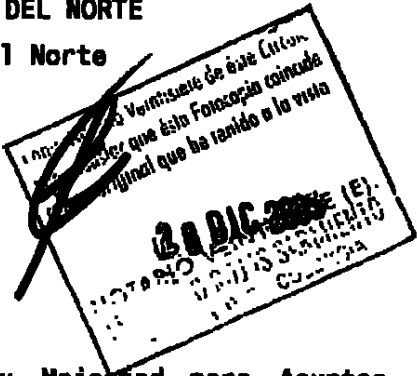
APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público
5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

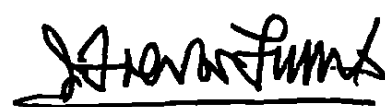
Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma: 

Date/Fecha: July 14, 2003

City/Country/Ciudad/Pais: New York, USA

Poder

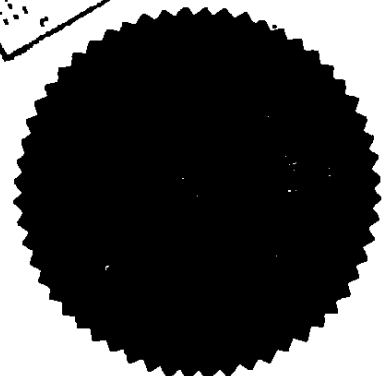
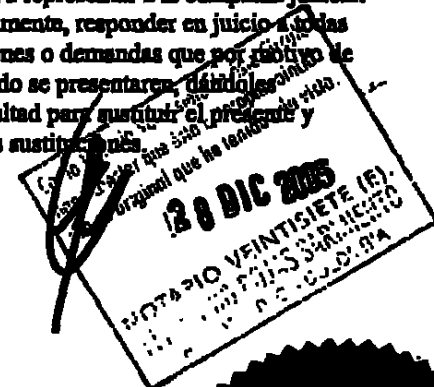
El suscrito,

Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dandoles plena y asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*
of legal age and domiciled in
New York, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant General Patent Counsel
of Pfizer Inc.

3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in
New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

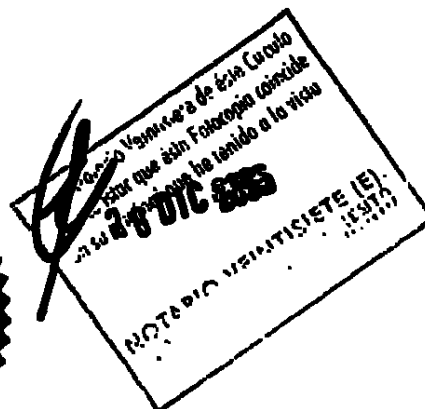
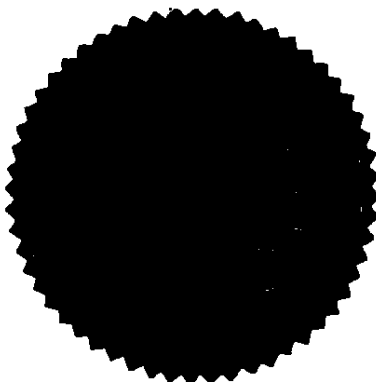
EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Epsom In Surrey

This 14th

Day Of July

2003

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNBY, ENGLAND AND FREEMAN



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

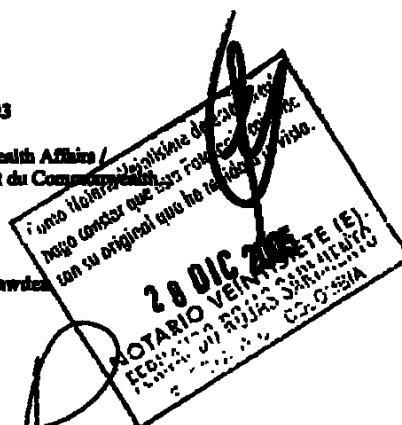
This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by K Greenwood
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/stamp de

5. at London/Londres
6. the/le 17 July 2003
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth
8. Number/num No G210434
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: R. Bowden



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat



If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Distrito de Columbia
Estados Unidos de América
2. El presente documento público fue firmado por: ALBERT L. THEMES.
3. Que actuó en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia
4. Lleva el sello de ALBERT L. THEMES Notario Público del Distrito de Columbia.
Se certificó
5. En Washington D. C.
6. El 21 de abril de 2006
7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia.
8. Bajo el Número 155623
9. Aparece el sello del Distrito de Columbia
10. Firmado por Patricia Elwood

CESION

Por contraprestación onerosa, cuyo recibo se reconoce por medio del presente, nosotros Shanghui HU, 8026 Avenida Navidad, Apt 28 San Diego California 92122 Estados Unidos de América; Carlos MARTINEZ, 1391 Enchante Way, Oceanside, California 92056 Estados Unidos de América; Junhua TAO 12142 Darkwood Road, San Diego, California 92129, Estados Unidos de América; Daniel Rida YAZBECK, 3957 Nobel Drive #231, San Diego, California 92122, Estados Unidos de América, por medio de la presente cada uno de nosotros vendemos, cedemos y transferimos a AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del estado de California, Estados Unidos de América con domicilio en 10777 Science Center Drive, San Diego, California 92121, Estados Unidos de América, la totalidad de nuestro derecho, título e interés con excepción a los límites incluidos en la parte de abajo en y a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos de América, teniendo como Expediente No.26187 en PFIZER INC., titulado **PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR AMINAS ENRIQUECIDAS ESTEREOISOMERICAMENTE** presentada en la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos el 4 de diciembre de 2003, y asignado el número de solicitud No. 60/527,143, y la totalidad de nuestro derecho, título e intereses, en los Estados Unidos de América, en y para todos nuestros inventos, ya sea unidos o solos, divulgado en dicha solicitud de patente; y la totalidad de nuestro derecho título e intereses en y para todas las solicitudes presentadas en los Estados Unidos de América para las

a
d
patentes de cualquiera o todos de los mencionados inventos; y la totalidad de nuestro derecho título e intereses en y para todos la patentes otorgadas en los Estados Unidos de América respecto a las anteriores solicitudes.

Y nosotros por medio de la presente vendemos, cedemos y transferimos a PFIZER INC., una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, cuya domicilio principal es 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, Estados Unidos de América, todo nuestro derecho, título e intereses, en todos los países del mundo, excepto los Estados Unidos de América, en y para todos nuestros inventos, ya sea unidos o solos, divulgados en dicha solicitud provisional de patente; todo nuestro derecho, título e interés en y para todas las solicitudes presentadas fuera de los Estados Unidos para patentes para cualesquiera o todos de los inventos mencionados; y nuestro derecho, título e interés en y para todas las Patentes concedidas fuera de los Estados Unidos de América en dicha solicitud de patente presentada fuera de los Estados Unidos de América; y el derecho a reivindicar prioridad por dicha solicitud provisional de patente bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, y bajo cualquier otro tratado o convenio a que los Estados Unidos haga parte, y que permita proveer similares privilegios de reivindicar prioridad, en todos los países del mundo excepto los Estados Unidos de América.

Y por medio de la presente nosotros acordamos, cuando sea requerido comunicar a dicha AGOURON PHARMACEUTICALS, INC. y a dicha PFIZER INC. y sus sucesores y cesionarios, cualquier hecho conocido por nosotros respecto a dicha invención,

testificar en cualquier proceso legal con respecto a dicha invención, y firmar todas las solicitudes o documentos necesarios para obtener y mantener la apropiada protección de la patente de dicha invención en todos los países del mundo.

10
/0

Por medio de la presente certifico que este es una fiel copia del anterior documento.

(Fdo) Denise R. Cooper
Notario Público, Estado de New Jersey
No. 2285561
Revisado en el condado de Morris
Cuya comisión vence el 20 de marzo de 2007.

Firmado y testificado el 26 de enero de 2004 en San Diego, CA.

(Fdo)Shanghul HU

En presencia de:

(Fdo) Pamela Hollander
Pamela Hollander
(Nombre aquí, firma en la parte de arriba)

Firmado y testificado el 26 de enero de 2004 en San Diego, CA
(Fdo)Carlos MARTINEZ,

En presencia de

(Fdo) Pamela Hollander
Pamela Hollander
(Nombre aquí, firma en la parte de arriba)

Firmado y testificado el 26 de enero de 2004 en San Diego,
CA.

(Fdo) Junhua TAO,

En presencia de

(Fdo) Pamela Hollander

Pamela Hollander

(Nombre aquí, firma en la parte de arriba)

Firmado y testificado el 26 de enero de 2004 en San Diego, CA

(Fdo) Daniel Rida YAZBECK,

En presencia de

(Fdo) Pamela Hollander

Pamela Hollander

(Nombre aquí, firma en la parte de arriba)



12
72

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America

2. This public document has been signed ALBERT L. THEMES

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

ALBERT L. THEMES, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
21

APRIL

2006

6. the _____ day of _____

7. by Secretary of the District of Columbia

8. No. 155623

9. Seal/Stamp



10. Signature
PATRICIA ELWOOD

Patricia Elwood

13
2
X

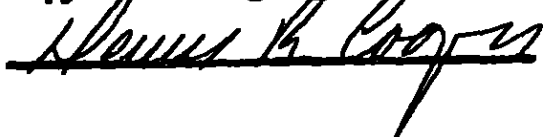
ASSIGNMENT

For valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, we Shanghai HU, 8028 Avenida Navidad, Apt. 28, San Diego, California 92122, United States of America; Carlos MARTINEZ, 1381 Enchante Way, Oceanside, California 92058, United States of America; Junhua TAO, 12142 Darkwood Road, San Diego, California 92128, United States of America; Daniel Rida YAZBECK, 3957 Nobel Drive #231, San Diego, California 92122, United States of America, hereby sell, assign and transfer unto AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., a corporation organized and existing under the laws of the State of California, United States of America, and having a place of business at 10777 Science Center Drive, San Diego, California 92121, United States of America, our entire right, title and interest, except as limited herein below, in and to provisional patent application of the United States of America, having PFIZER INC. Docket No. 20187 entitled METHODS FOR THE PREPARATION OF STEREOISOMERICALLY ENRICHED AMINES filed in the United States Patent and Trademark Office on December 4, 2003 and assigned application number 60/527,143 and our entire right, title and interest, in the United States of America, in and to all our inventions, whether joint or sole, disclosed in said patent application; and our entire right, title and interest in and to all applications filed in the United States of America for Letters Patent for any or all of said inventions; and our entire right, title and interest in and to all Letters Patent granted in the United States of America on the foregoing applications;

and we hereby sell, assign and transfer unto PFIZER INC., a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America, and having a place of business at 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, United States of America, our entire right, title and interest, in all countries of the world except the United States of America, in and to all our inventions, whether joint or sole, disclosed in said provisional patent application; and our entire right, title and interest in and to all patent applications filed outside the United States of America for Letters Patent for any or all of said inventions; and our entire right, title and interest in and to all Letters Patent granted outside the United States of America on said patent applications filed outside the United States of America; and the right to claim priority from said provisional patent application under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, and under any and all other such treaties and agreements to which the United States of America is a party and which afford similar priority-claiming privileges, in all countries of the world except the United States of America;

and we hereby agree, whenever requested, to communicate to said AGOURON PHARMACEUTICALS, INC. and said PFIZER INC., and their successors and assigns, any facts known to us respecting said inventions, to testify in any legal proceeding respecting said inventions, and to execute all applications or papers necessary to obtain and maintain proper patent protection on

I hereby certify that this is a true
copy of the foregoing document.



1

Denise R. Cooper
Notary Public, State of New Jersey
No. 2285561
Qualified in Morris County
Commission Expires March 20, 2007

I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT

SAMI SWADEK

4-21-06

Subscribed and sworn to before me, in my presence, this
21 day of April, 2006, a Notary Public
In and for the District of Columbia

Albert L. Themes
Notary Public

My commission expires 6/14/09

ALBERT L. THEMES
NOTARY PUBLIC DISTRICT OF COLUMBIA
My Commission Expires June 14, 2009

14
TH

said inventions in all countries of the world.

Signed and witnessed this 26 day of Jan 2004 at San Diego CA

[Signature]
Shanghai HU

In the presence of:

[Signature]

James Holland

[print name here, sign above]

Signed and witnessed this 26 day of January 2004 at San Diego, CA

[Signature]
Carlos MARTINEZ

In the presence of:

[Signature]

James Holland

[print name here, sign above]

Signed and witnessed this 26 day of January 2004 at San Diego, CA

[Signature]
Junhua TAO

In the presence of:

[Signature]

James Holland

[print name here, sign above]

15
X

Signed and witnessed this 26 day of January, 2004 at
San Diego, CA

Darryl YARBEEK
Darryl Rida YARBEEK

In the presence of:

[Signature]

Doreen J. [Signature]

[print name here, sign above]

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 June 2005 (16.06.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/054186 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07D 207/00

(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; Pfizer Inc., 301
Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).

(21) International Application Number:
PCT/IB2004/003812

(22) International Filing Date:
22 November 2004 (22.11.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/527,143 4 December 2003 (04.12.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
INC. [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HU, Shanghai
[CN/US]; Agouron Pharmaceuticals Inc., A Pfizer Com-
pany, 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121
(US). MARTINEZ, Carlos, Alberto [CO/US]; Agouron
Pharmaceuticals Inc., A Pfizer Company, 10777 Science
Center Drive, San Diego, CA 92121 (US). TAO, Junhua
[CN/US]; Agouron Pharmaceuticals Inc., A Pfizer com-
pany, 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121
(US). YAZBECK, Daniel, Rida [US/US]; Agouron
Pharmaceuticals Inc., A Pfizer company, 10777 Science
Center Drive, San Diego, CA 92121 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

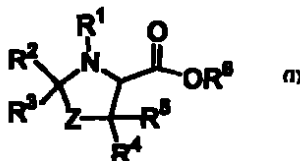
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR THE PREPARATION OF STEREOISOMERICALLY ENRICHED AMINES



(57) Abstract: The present invention relates to methods of preparing a stereoisomer-
ically enriched compound of formula (I), wherein R⁶ is hydrogen, comprising treating
a compound of formula (I), wherein R⁶ is chosen from C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl,
C₂-C₁₀ alkenyl, -(CR⁷R⁸)_n (C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁷R⁸)_n (4-10 membered heterocyclic), and
wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with
at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸), with a bio-
catalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous

solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

17
X

-1-

METHODS FOR THE PREPARATION OF STEREOISOMERICALLY ENRICHED AMINES**Background of the Invention**

This application claims priority to United States Patent Application No. 60/627,143,
5 filed December 4, 2003, which is hereby incorporated by reference.

The present invention relates to methods for the preparation of stereoisomerically enriched amines. The stereoisomerically enriched amines disclosed herein are useful in the preparation of compounds that inhibit the Human Immunodeficiency virus (HIV) protease enzyme.

10 Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) causes a gradual breakdown of the body's immune system as well as progressive deterioration of the central and peripheral nervous systems. Since its initial recognition in the early 1980's, AIDS has spread rapidly and has now reached epidemic proportions within a relatively limited segment of the population. Intensive research has led to the discovery of the responsible agent, human T-lymphotropic
15 retrovirus III (HTLV-III), now more commonly referred to as HIV.

HIV is a member of the class of viruses known as retroviruses and is the etiologic agent of AIDS. The retroviral genome is composed of RNA, which is converted to DNA by reverse transcription. This retroviral DNA is then stably integrated into a host cell's chromosome and, employing the replicative processes of the host cells, produces new
20 retroviral particles and advances the infection to other cells. HIV appears to have a particular affinity for the human T-4 lymphocyte cell, which plays a vital role in the body's immune system. HIV infection of these white blood cells depletes this white cell population. Eventually, the immune system is rendered inoperative and ineffective against various opportunistic diseases such as, among others, pneumocystic carini pneumonia, Kaposi's
25 sarcoma, and cancer of the lymph system.

Although the exact mechanism of the formation and working of the HIV virus is not understood, identification of the virus has led to some progress in controlling the disease. For example, the drug azidothymidine (AZT) has been found effective for inhibiting the reverse transcription of the retroviral genome of the HIV virus, thus giving a measure of control,
30 though not a cure, for patients afflicted with AIDS. The search continues for drugs that can cure or at least provide an improved measure of control of the deadly HIV virus and thus the treatment of AIDS and related diseases.

Retroviral replication routinely features post-translational processing of polypeptides. This processing is accomplished by virally encoded HIV protease enzyme. This yields mature
35 polypeptides that will subsequently aid in the formation and function of infectious virus. If this

18
X

-2-

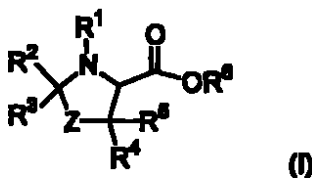
molecular processing is stifled, then the normal production of HIV is terminated. Therefore, inhibitors of HIV protease may function as anti-HIV viral agents.

HIV protease is one of the translated products from the HIV structural protein pol 25 gene. This retroviral protease specifically cleaves other structural polypeptides at discrete sites to release these newly activated structural proteins and enzymes, thereby rendering the virion replication-competent. As such, inhibition of the HIV protease by potent compounds may prevent proviral integration of infected T-lymphocytes during the early phase of the HIV-1 life cycle, as well as inhibit viral proteolytic processing during its late stage. Additionally, the protease inhibitors may have the advantages of being more readily available, longer lived in virus, and less toxic than currently available drugs, possibly due to their specificity for the retroviral protease.

Methods for preparing compounds useful as HIV protease inhibitors have been described in, e.g., U.S. Patent No. 5,962,640; U.S. Patent No. 5,932,550; U.S. Patent No. 6,222,043; U.S. Patent No. 5,644,028; WO 02/100844, Australian Patent No. 705193; Canadian Patent Application No. 2,179,935; European Patent Application No. 0 751 145; Japanese Patent Application No. 100867489; Y. Hayashi, et al., J. Org. Chem., 66, 5537-5544 (2001); K. Yoshimura, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8675-8680 (1999); and, T. Mimoto, et al., J. Med. Chem., 42, 1789-1802 (1999). Many HIV protease inhibitors are complex molecules that contain one or more asymmetric carbon atoms. Preparing such compounds in an efficient and stereochemically selective manner is a challenge facing synthetic chemists. Although some stereoselective synthetic methods have been developed to address these needs, they are generally not applicable to a wide range of molecules. As such, the need still exists for the development of stereoselective methods that can be used to efficiently prepare such complex molecules.

Summary of the Invention

The present invention relates to methods of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I),



wherein:

Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸)-;

19
X

-3-

R^1 is hydrogen, $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$, or $-Si(R^7)_3$, wherein said C_6-C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^7R^8)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^7R^8)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^6 is hydrogen;

each R^7 and R^8 is independently chosen from hydrogen, halo, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^8R^9)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^8R^9)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^8$, and $-N(R^8R^9)$;

each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and

t is an integer from 0 to 6;

said method comprising:

treating a compound of formula (I), wherein R^1 , R^2 , R^3 , R^4 and R^5 are as defined above and R^6 is chosen from C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^7R^8)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

Another aspect of the present invention provides any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$ or $-(CR^7R^8)_t$;

R^1 is $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$, or $-Si(R^7)_3$, wherein said C_6-C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, and C_1-C_{10} alkyl;

-4-

R^6 is hydrogen;

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^9R^{10})_t(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^9R^{10})_t(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^{10})$; each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and t is an integer from 0 to 5.

In still another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)_t$;

R^1 is $-(CH_2)_t(C_6-C_{14}$ aryl), $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$, or $-C(O)C(O)OR^7$, wherein said C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, and C_1 - C_{10} alkyl;

R^6 is hydrogen;

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^9R^{10})_t(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^9R^{10})_t(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^{10})$; each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and t is an integer from 1 to 3.

In another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)_t$;

R^1 is $-(CH_2)_t(C_6-C_{14}$ aryl), $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$, or $-C(O)C(O)OR^7$, wherein said C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen, methyl, ethyl, butyl, and pentyl;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, methyl, ethyl, butyl, and pentyl;

R^6 is hydrogen;

-5-

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, and C_6 - C_{14} aryl, wherein said C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^9)$; and each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl.

5

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)-$;

R^1 is $-CH_2Ph$, $-C(O)OR^7$, or $-C(O)C(O)OR^7$;

10

R^2 and R^3 are hydrogen;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen and methyl;

R^6 is hydrogen; and

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl.

15

The present invention also provides any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)-$;

R^1 is $-CH_2Ph$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$, or $-C(O)C(O)OCH_3$;

R^2 and R^3 are hydrogen;

20

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen and methyl;

R^6 is hydrogen; and

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, fluorine, methyl, and $-OCH_3$.

In another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

25

Z is S;

R^1 is $-CH_2Ph$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$, or $-C(O)C(O)OCH_3$;

R^2 and R^3 are hydrogen;

R^4 and R^5 are methyl; and

30

R^6 is hydrogen.

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

Z is $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)-$;

22

-8-

R^1 is $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$, or $-Si(R^7)_3$, wherein said C_6-C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl;

5 R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, and C_1-C_{10} alkyl;

R^6 is hydrogen;

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^9R^9)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^9R^9)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^9)$;

10 each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and

t is an integer from 0 to 5.

Another aspect of the present invention provides any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

15 Z is $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)_t$;

R^1 is $-CH_2Ph$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, or $-C(O)C(O)OR^7$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, and C_1-C_{10} alkyl;

20 R^6 is hydrogen;

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^9R^9)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^9R^9)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^9)$;

25 each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and

t is an integer from 1 to 3.

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I), wherein:

30 Z is $-(CR^7R^8)_t$;

R^1 is $-CH_2Ph$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$, or $-C(O)C(O)OCH_3$;

R^2 and R^3 are hydrogen;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen and methyl, ethyl, butyl and

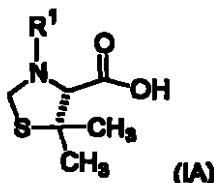
35 pentyl;

-7-

R^6 is hydrogen; and

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, fluorine, chlorine, C_1 - C_{10} alkyl, and C_1 - C_{10} alkoxy.

- 5 The present invention further relates to methods of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IA),



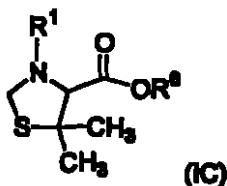
wherein:

R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, or $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$; and

- 10 R^7 is C_1 - C_{10} alkyl;

said method comprising:

treating a compound of formula (IC),



- 15 wherein R^1 is as defined above and R^8 is chosen from C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-\text{CH}_2(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said $C_6\text{-C}_{14}$ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^7)$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

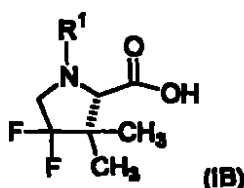
20

- The present invention further relates to any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IA), wherein R^1 is $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, comprising treating a compound of formula (IC), wherein R^1 is $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_2$ and R^8 is $-\text{CH}_3$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.
- 25

-8-

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IA), wherein R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, comprising treating a compound of formula (IC), wherein R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$ and R^8 is $-\text{CH}_3$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

In another aspect of the present invention are provided methods of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IB),



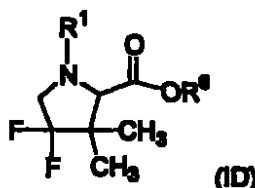
10 wherein:

R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, or $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$; and

R^7 is $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl;

said method comprising:

treating a compound of formula (ID),



15

wherein R^1 is as defined above and R^8 is chosen from $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ alkenyl, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ alkynyl, $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-\text{CH}_2(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^7)$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

The present invention further relates to any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IB), wherein R^1 is $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, comprising treating a compound of formula (ID), wherein R^1 is $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ and R^8 is $-\text{CH}_3$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

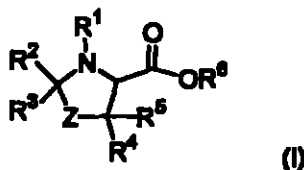
25

-8-

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing stereoisomerically enriched compound of formula (IB), wherein R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, comprising treating a compound of formula (ID), wherein R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$ and R^6 is $-\text{CH}_3$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

Also provided in the present invention are any of the methods described herein of preparing stereoisomerically enriched compounds of formulas (I), (IA), and (IB), wherein said biocatalyst is chosen from an alkaline protease, an esterase, a lipase, a hydrolase, and any combination thereof. In another aspect of the present invention are provided methods wherein said biocatalyst is chosen from *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, and Pig Liver esterase.

The present invention also relates to a method for the resolution of a compound of formula (I),



wherein:

Z is O, S, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{CH}_2$, or $-(\text{CR}^7\text{R}^8)-$;

R^1 is hydrogen, $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, or $-\text{Si}(\text{R}^7)_3$, wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl}$ is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ alkyl}$, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen, $\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ alkyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_{10} \text{ alkenyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_{10} \text{ alkynyl}$, $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl}$ and $4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic}$ are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ alkyl}$, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^8)$;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ alkyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_{10} \text{ alkenyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_{10} \text{ alkynyl}$, $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl}$ and $4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic}$ are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ alkyl}$, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^8)$;

R^6 is chosen from $\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ alkyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_{10} \text{ alkenyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_{10} \text{ alkynyl}$, $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_x(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl}$ and $4\text{-}10$

-10-

membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);

R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁹R⁹)(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁹R⁹)(4-10 membered heterocyclic), wherein
 5 said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁹, and -N(R⁹R⁹);

each R⁹ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl; and

t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

10 treating the compound of formula (I) with a biocatalyst in an aqueous solvent, an organic solvent, or a mixture of aqueous and organic solvents, to afford a stereoisomerically enriched compound of formula (I) wherein R⁸ is hydrogen.

Another aspect of the present invention provides any of the methods described herein
 15 for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸);

R¹ is -(CR⁷R⁸)(C₆-C₁₄ aryl), -CH₂CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, -C(O)C(O)OR⁷, or -S(R⁷)₂, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);

20 R² and R³ are independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl;

R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen, halo, and C₁-C₁₀ alkyl;

R⁶ is hydrogen;

R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁹R⁹)(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁹R⁹)(4-10 membered
 25 heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁹, and -N(R⁹R⁹);

each R⁹ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl; and

t is an integer from 0 to 5.

30 In still another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸);

R¹ is -(CH₂)(C₆-C₁₄ aryl), -CH₂CH=CH₂, -C(O)OR⁷, or -C(O)C(O)OR⁷, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀
 35 alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);

-11-

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, and C_1 - C_{10} alkyl;

R^6 is hydrogen;

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy,

- 5 C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^9R^8)_t(C_6$ - C_{14} aryl), and $-(CR^9R^8)_t$ (4-10 membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^8)$; each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and t is an integer from 1 to 3.

10

In another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)$;

R^1 is $-(CH_2)(C_6$ - C_{14} aryl), $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$, or $-C(O)C(O)OR^7$, wherein said

- 15 C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 and R^3 are independently chosen from hydrogen, methyl, ethyl, butyl, and pentyl;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen, halo, methyl, ethyl, butyl, and pentyl;

- 20 R^6 is hydrogen;

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy,

C_2 - C_{10} alkenyl, and C_6 - C_{14} aryl, wherein said C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^8$, and $-N(R^8R^8)$; and

each R^8 is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl.

25

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, $C=O$, $C=CH_2$, or $-(CR^7R^8)$;

R^1 is $-CH_2Ph$, $-C(O)OR^7$, or $-C(O)C(O)OR^7$;

- 30 R^2 and R^3 are hydrogen;

R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen and methyl;

R^6 is hydrogen; and

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, and C_1 - C_{10}

alkoxy.

35

-12-

The present invention also provides any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

Z is O, S, C=O, C=CH₂, or $-(CR^7R^8)-$;

R¹ is $-CH_2Ph$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$, or $-C(O)C(O)OCH_3$;

5 R² and R³ are hydrogen;

R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen and methyl;

R⁶ is hydrogen; and

R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, fluorine, methyl, and $-OCH_3$.

10 In another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

Z is S;

R¹ is $-CH_2Ph$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$, or $-C(O)C(O)OCH_3$;

R² and R³ are hydrogen;

15 R⁴ and R⁵ are methyl; and

R⁶ is hydrogen.

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

20 Z is C=O, C=CH₂, or $-(CR^7R^8)-$;

R¹ is $-(CR^7R^8)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$, or $-Si(R^7)_3$, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R² and R³ are independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl;

25 R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen, halo, and C₁-C₁₀ alkyl;

R⁶ is hydrogen;

R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, $-(CR^9R^9)_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^9R^9)_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally

30 substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^9)$;

each R⁹ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl; and

t is an integer from 0 to 5.

35 Another aspect of the present invention provides any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

29

-13-

Z is C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸)-;

R¹ is -CH₂Ph, -CH₂CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, or -C(O)C(O)OR⁷;

R² and R³ are independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl;

R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen, halo, and C₁-C₁₀ alkyl;

5 R⁶ is hydrogen;

R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁹R¹⁰)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁹R¹⁰)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁹, and -N(R⁹R¹⁰);

10 each R⁹ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl; and

t is an integer from 1 to 3.

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein for the resolution of a compound of formula (I), wherein:

15 Z is -(CR⁷R⁸)-;

R¹ is -CH₂Ph, -CH₂CH=CH₂, -C(O)OCH₃, -C(O)OC(CH₃)₃, or -C(O)C(O)OCH₃;

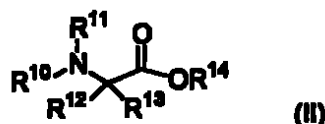
R² and R³ are hydrogen;

R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen and methyl, ethyl, butyl and pentyl;

20 R⁶ is hydrogen; and

R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, fluorine, chlorine, C₁-C₁₀ alkyl, and C₁-C₁₀ alkoxy.

Another aspect of the present invention provides a method of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II),



wherein:

30 R¹⁰ is hydrogen, -(CR¹⁶R¹⁶)_t(C₆-C₁₄ aryl), -CH₂CH=CH₂, -C(O)R¹⁶, -C(O)OR¹⁶, -C(O)C(O)OR¹⁶, or -Si(R¹⁶)₃, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁶, and -N(R¹⁶R¹⁶);

R¹¹ is hydrogen, C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR¹⁶R¹⁶)_t(C₆-C₁₄ aryl), or -(CR¹⁶R¹⁶)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered

-14-

heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁸, and -N(R¹⁵R¹⁶);

R¹² and R¹³ are independently chosen from hydrogen, C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR¹⁸R¹⁹)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR¹⁸R¹⁹)_t(4-10 membered heterocyclic),

5 wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁸, and -N(R¹⁵R¹⁶), provided that R¹² and R¹³ cannot both be hydrogen;

R¹⁴ is hydrogen;

10 R¹⁸ and R¹⁹ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR¹⁷R¹⁷)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR¹⁷R¹⁷)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁷, and -N(R¹⁷R¹⁷);

each R¹⁷ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl; and

15 t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

treating a compound of formula (II), wherein R¹⁰, R¹¹, R¹², and R¹³ are as defined above, and R¹⁴ is chosen from C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR¹⁸R¹⁹)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR¹⁸R¹⁹)_t(4-10 membered heterocyclic), and wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁸, and -N(R¹⁵R¹⁶), with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

25 In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II), wherein:

30 R¹⁰ is -(CR¹⁸R¹⁹)_t(C₆-C₁₄ aryl), -C(O)OR¹⁸, or -C(O)C(O)OR¹⁸, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁸, and -N(R¹⁵R¹⁶);

R¹¹ is hydrogen, C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR¹⁸R¹⁹)_t(C₆-C₁₄ aryl), or -(CR¹⁸R¹⁹)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR¹⁸, and -N(R¹⁵R¹⁶);

-15-

R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})_n(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^{15}R^{16})_n(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{15}$, and $-N(R^{15}R^{16})$, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

R^{14} is hydrogen;

R^{16} and R^{18} are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})_n(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^{17}R^{17})_n(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17})$;

each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and
t is an integer from 0 to 5.

In yet another aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II), wherein:

R^{10} is $-C(O)OR^{15}$ or $-C(O)C(O)OR^{15}$;

R^{11} is hydrogen or C_1 - C_{10} alkyl;

R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, and C_2 - C_{10} alkynyl, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

R^{14} is hydrogen; and

R^{15} is C_1 - C_{10} alkyl.

In still a further aspect of the present invention are provided any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II), wherein:

R^{10} is $-C(O)OR^{15}$ or $-C(O)C(O)OR^{15}$;

R^{11} is hydrogen;

R^{12} is hydrogen;

R^{13} is C_2 - C_{10} alkenyl;

R^{14} is hydrogen; and

R^{15} is C_1 - C_{10} alkyl.

32
32

-16-

Another aspect of the present invention provides any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II), wherein:

R^{10} is $-C(O)OR^{16}$ or $-C(O)C(O)OR^{16}$;

R^{11} is hydrogen;

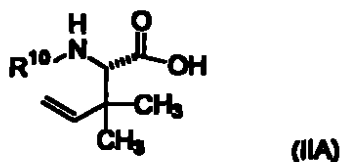
5 R^{12} is hydrogen;

R^{13} is C_2-C_8 alkenyl;

R^{14} is hydrogen; and

R^{15} is $-C(CH_3)_3$.

10 The present invention also relates to methods of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IIA),



wherein:

15 R^{10} is chosen from hydrogen, $-(CR^{16}R^{16})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^{16}$, $-C(O)OR^{16}$, and $-C(O)C(O)OR^{16}$; and

each R^{16} and R^{16} are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{17}R^{17})_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and

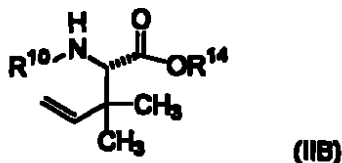
20 $-N(R^{17}R^{17})$;

each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and

t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

treating a compound of formula (IIB),



25

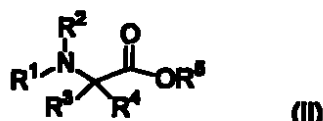
wherein R^{10} is as defined above, and R^{14} is C_1-C_{10} alkyl, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

-17-

Also provided in the present invention are any of the methods described herein of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IIA), wherein R^{10} is $-C(O)OC(CH_3)_3$, said method comprising, treating a compound of formula (IIB), wherein R^{10} is as defined above and R^{14} is methyl, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

Also provided in the present invention are any of the methods described herein of preparing stereoisomerically enriched compounds of formulas (II) and/or (IIA), wherein said biocatalyst is chosen from an alkaline protease, an esterase, a lipase, a hydrolase, and any combination thereof. In another aspect of the present invention are provided methods wherein said biocatalyst is chosen from *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, and Pig Liver esterase.

In still another aspect of the present invention are provided methods for the resolution of a compound of formula (II),



wherein:

R^1 is hydrogen, $-(CR^7R^8)_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$, or $-Si(R^7)_3$, wherein said C_6-C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^2 is hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^7R^8)_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, or $-(CR^7R^8)_x(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

R^3 and R^4 are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^7R^8)_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^7R^8)_x(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$, provided that R^3 and R^4 cannot both be hydrogen;

R^5 is chosen from C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^7R^8)_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^7R^8)_x(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^7$, and $-N(R^7R^8)$;

34

-18-

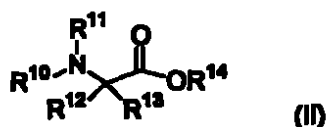
R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^9R^8)_t(C_6$ - C_{14} aryl), and $-(CR^9R^8)_t$ (4-10 membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^9$, and $-N(R^9R^8)$;

- 5 each R^9 is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and
 t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

- treating the compound of formula (II) with a biocatalyst in an aqueous solvent, an organic solvent, or a mixture of aqueous and organic solvents, to afford a stereoisomerically enriched compound of formula (II) wherein R^8 is hydrogen.

In still a further aspect of the present invention are provided methods of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II),



- 15 wherein:

R^{10} is hydrogen, $-(CR^{16}R^{16})_t(C_6$ - C_{14} aryl), $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^{16}$, $-C(O)OR^{16}$, $-C(O)C(O)OR^{16}$, or $-Si(R^{16})_3$, wherein said C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{16}$, and $-N(R^{16}R^{16})$;

- 20 R^{11} is hydrogen, C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{16}R^{16})_t(C_6$ - C_{14} aryl), or $-(CR^{16}R^{16})_t$ (4-10 membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{16}$, and $-N(R^{16}R^{16})$;

- 25 R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{16}R^{16})_t(C_6$ - C_{14} aryl), and $-(CR^{16}R^{16})_t$ (4-10 membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{16}$, and $-N(R^{16}R^{16})$, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

R^{14} is hydrogen;

- 30 R^{16} and R^{16} are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})_t(C_6$ - C_{14} aryl), and $-(CR^{17}R^{17})_t$ (4-10 membered heterocyclic), wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17})$;

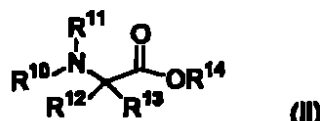
-19-

each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and
 t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

- (i) treating a compound of formula (II), wherein R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , and R^{14} are as defined above, with a chiral, non-racemic base to afford a mixture of diastereomeric salts;
- (ii) separating said diastereomeric salts from each other; and
- (iii) converting said diastereomeric salt to a stereoisomerically enriched compound of formula (II).

In yet another aspect of the present invention are provided methods for the resolution of a compound of formula (II),



wherein:

R^{10} is hydrogen, $-(CR^{15}R^{16})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)C(O)OR^{15}$, or $-Si(R^{15})_3$, wherein said C_6 - C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{15}$, and $-N(R^{15}R^{16})$;

R^{11} is hydrogen, C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, or $-(CR^{15}R^{16})_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{15}$, and $-N(R^{15}R^{16})$;

R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1 - C_{10} alkyl, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{15}R^{16})_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{15}$, and $-N(R^{15}R^{16})$, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

R^{14} is hydrogen;

R^{15} and R^{16} are independently chosen from hydrogen, halo, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} alkoxy, C_2 - C_{10} alkenyl, C_2 - C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{17}R^{17})_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6 - C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1 - C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17})$;

each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1 - C_{10} alkyl; and
 t is an integer from 0 to 5;

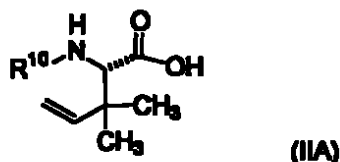
36
36

-20-

said method comprising:

- (I) treating a compound of formula (II), wherein R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , and R^{14} are as defined above, with a chiral, non-racemic base to afford a mixture of diastereomeric salts;
- (II) separating said diastereomeric salts from each other; and
- 5 (III) converting said diastereomeric salt to a stereoisomerically enriched compound of formula (II).

The present invention also relates to methods of resolving a compound of formula (IIA),



10

wherein:

- R^{10} is chosen from hydrogen, $-(CR^{16}R^{16})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^{18}$, $-C(O)OR^{18}$, and $-C(O)C(O)OR^{18}$; and
- each R^{16} and R^{18} are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{17}R^{17})_t(4-10$
- 15 membered heterocyclic), wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17})$;
- each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and
- 20 t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

- (I) treating a compound of formula (IIA), wherein R^{10} is as defined above, with a chiral, non-racemic base to afford a mixture of diastereomeric salts;
- (II) separating said diastereomeric salts from each other; and
- 25 (III) converting said diastereomeric salt to a stereoisomerically enriched compound of formula (IIA).

Also provided in the present invention are any of the methods described herein of resolving a compound of formula (IIA), wherein R^{10} is $-C(O)OC(CH_3)_3$.

- Also included in the present invention are any of the methods described herein of
- 30 resolving a compound of formula (IIA), wherein said chiral, non-racemic base is either (R)-(-)-2-phenylglycinol or (S)-(+)-2-phenylglycinol. Other resolving agents useful in the present invention include other chiral, non-racemic amines including, but not limited to, either

27
37

-21-

enantiomer of 2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol and either enantiomer of 1-phenyl-1-aminoethane.

As used herein, the terms "comprising" and "including" are used in their open, non-limiting sense.

5 As used herein, the term "HIV" means Human Immunodeficiency Virus. The term "HIV protease," as used herein, means the Human Immunodeficiency Virus protease enzyme.

The term "C₁-C₁₀ alkyl", as used herein, unless otherwise indicated, includes saturated monovalent hydrocarbon radicals having straight, branched, or cyclic moieties (including fused and bridged bicyclic and spirocyclic moieties), or a combination of the
10 foregoing moieties, and containing from 1-10 carbon atoms. For an alkyl group to have cyclic moieties, the group must have at least three carbon atoms. Examples of such groups include, but are not limited to, methyl, ethyl, propyl, iso-propyl, n-butyl, iso-butyl, tert-butyl, and such.

The term "C₂-C₁₀ alkenyl", as used herein, unless otherwise indicated, includes alkyl moieties having at least one carbon-carbon double bond wherein alkyl is as defined above and
15 including E and Z isomers of said alkenyl moiety, and having from 2 to 10 carbon atoms.

The term "C₂-C₁₀ alkynyl", as used herein, unless otherwise indicated, includes alkyl moieties having at least one carbon-carbon triple bond wherein alkyl is as defined above, and containing from 2 to 10 carbon atoms.

A "C₃-C₁₀ cycloalkyl group" is intended to mean a saturated or partially saturated,
20 monocyclic, or fused or spiro polycyclic, ring structure having a total of from 3 to 10 carbon ring atoms (but no heteroatoms). Exemplary cycloalkyls include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclopentenyl, cyclohexyl, cycloheptyl, adamantyl, and like groups.

The term "C₆-C₁₀ aryl", as used herein, unless otherwise indicated, includes an
25 organic radical derived from an aromatic hydrocarbon by removal of one hydrogen, such as phenyl or naphthyl. The terms "Ph" and "phenyl," as used herein, mean a -C₆H₅ group.

The term "4-10 membered heterocyclic", as used herein, unless otherwise indicated, includes aromatic and non-aromatic heterocyclic groups containing one to four heteroatoms each selected from O, S and N, wherein each heterocyclic group has from 4-10 atoms in its ring system, and with the proviso that the ring of said group does not contain two adjacent O or S
30 atoms. Furthermore, the sulfur atoms contained in such heterocyclic groups may be oxidized with one or two sulfur atoms. Non-aromatic heterocyclic groups include groups having only 4 atoms in their ring system, but aromatic heterocyclic groups must have at least 5 atoms in their ring system. The heterocyclic groups include benzo-fused ring systems. An example of a 4 membered heterocyclic group is azetidyl (derived from azetidine). An example of a 5
35 membered heterocyclic group is thiazolyl and an example of a 10 membered heterocyclic

20
30

-22-

group is quinolinyl. Examples of non-aromatic heterocyclic groups are pyrrolidinyl, tetrahydrofuranyl, dihydrofuranyl, tetrahydrothienyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, tetrahydrothiopyranyl, piperidino, morpholino, thiomorpholino, thioxanyl, piperazinyl, azetidyl, oxetanyl, thietanyl, homopiperidinyl, oxepanyl, thiepanyl, oxazepinyl, diazepinyl, thiazepinyl, 1,2,3,6-tetrahydropyridinyl, 2-pyrroliyl, 3-pyrroliyl, indolinyl, 2H-pyranyl, 4H-pyranyl, dioxanyl, 1,3-dioxolanyl, pyrazolinyl, dithianyl, dithiolanyl, dihydropyranyl, dihydrothienyl, dihydrofuranyl, pyrazolidinyl, imidazolinyl, imidazolidinyl, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanyl, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanyl, 3H-indolyl and quinolizyl. Examples of aromatic heterocyclic groups are pyridinyl, imidazolyl, pyrimidinyl, pyrazolyl, triazolyl, pyrazinyl, tetrazolyl, furyl, thienyl, isoxazolyl, thiazolyl, oxazolyl, isothiazolyl, pyrrolyl, quinolinyl, isoquinolinyl, indolyl, benzimidazolyl, benzofuranyl, cinnolinyl, indazolyl, indolizyl, phthalazinyl, pyridazinyl, triazinyl, isoindolyl, pteridinyl, purinyl, oxadiazolyl, thiadiazolyl, furazanyl, benzofurazanyl, benzothiophenyl, benzothiazolyl, benzoxazolyl, quinoxalinyl, quinoxalyl, naphthyridinyl, and furopyridinyl. The foregoing groups, as derived from the groups listed above, may be C-attached or N-attached where such is possible. For instance, a group derived from pyrrole may be pyrrol-1-yl (N-attached) or pyrrol-3-yl (C-attached). Further, a group derived from imidazole may be imidazol-1-yl (N-attached) or imidazol-3-yl (C-attached). An example of a heterocyclic group wherein 2 ring carbon atoms are substituted with oxo (=O) moieties is 1,1-dioxo-thiomorpholinyl.

A "heteroaryl group" is intended to mean a monocyclic or fused or spiro polycyclic, aromatic ring structure having from 4 to 18 ring atoms, including from 1 to 5 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, and sulfur. Illustrative Examples of heteroaryl groups include pyrrolyl, thienyl, oxazolyl, pyrazolyl, thiazolyl, furyl, pyridinyl, pyrazinyl, triazolyl, tetrazolyl, indolyl, quinolinyl, quinoxalinyl, benzthiazolyl, benzodioxinyl, benzodioxolyl, benzooxazolyl, and the like.

The term "alkoxy", as used herein, unless otherwise indicated, includes O-alkyl groups wherein alkyl is as defined above.

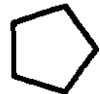
The terms "halogen" and "halo," as used herein represent chlorine, fluorine, bromine or iodine.

The term "substituted," means that the specified group or moiety bears one or more substituents. The term "unsubstituted," means that the specified group bears no substituents. The term "optionally substituted" means that the specified group is unsubstituted or substituted by one or more substituents.

39

-23-

In accordance with a convention used in the art, the symbol  is used in structural formulae herein to depict the bond that is the point of attachment of the moiety or substituent to the core or backbone structure. In accordance with another convention, in some structural formulae herein the carbon atoms and their bound hydrogen atoms are not explicitly depicted,

5 e.g.,  represents a methyl group,  represents an ethyl group,  represents a cyclopentyl group, etc.

The term "stereoisomers" refers to compounds that have identical chemical constitution, but differ with regard to the arrangement of their atoms or groups in space. In particular, the term "enantiomers" refers to two stereoisomers of a compound that are non-
10 superimposable mirror images of one another. The terms "racemic" or "racemic mixture," as used herein, refer to a 1:1 mixture of enantiomers of a particular compound. The term "diastereomers", on the other hand, refers to the relationship between a pair of stereoisomers that comprise two or more asymmetric centers and are not mirror images of one another.

The term "stereochemically-enriched" product, when used herein, refers to a reaction
15 product wherein a particular stereoisomer is present in a statistically significant greater amount relative to the other possible stereoisomeric products. For example, a product that comprises more of one enantiomer than the other would constitute a stereochemically enriched product. Similarly, a product that comprises more of one diastereoisomer than others would also constitute a stereochemically enriched product. The methods and
20 processes contained herein are said to afford a "stereochemically enriched" product. In such cases, the methods and processes contained herein begin with a mixture of stereoisomeric compounds in which all possible stereoisomers are present in about an equal amount and afford a product in which at least one stereoisomer is present in a statistically significant greater amount than the others.

25 If the starting material constitutes a mixture of stereoisomers, such as a racemic mixture, one stereoisomer may react more slowly than the other in the presence of a chiral, non-racemic reagent or catalyst, such as a biocatalyst, an optically active base, or an optically active acid. Such a reaction may be referred to herein as a kinetic resolution, wherein the reactant enantiomers are resolved by differential reaction rates to yield both stereochemically-
30 enriched product and stereochemically-enriched, unreacted starting material. Kinetic resolution is usually achieved by the use of a sufficient amount of a chiral, non-racemic reagent or catalyst to react with only one stereoisomer of the starting material.

40

-24-

The term "chiral, non-racemic base," as used herein, means a basic compound that can exist in enantiomeric form and is not present in an equal amount with its correspondingly opposite enantiomer. For example, the compound 2-phenylglycinol exists as two enantiomers of opposite configuration, the so-called (R)- and (S)-enantiomers. If the (R)- and the (S)-enantiomers are present in equal amounts, such a mixture is said to be "racemic." If, however, one enantiomer is present in an amount greater than the other, the mixture is said to be "non-racemic."

The terms "resolution" and "resolving" mean a method of physically separating stereoisomeric compounds from a mixture of stereoisomers, such as a racemic mixture comprising two enantiomers of a particular compound. As used herein, "resolution" and "resolving" are meant to include both partial and complete resolution.

The terms "enzymatic process," "enzymatic method," "enzymatic reaction," or "enzymatic resolution," denote a process or method or reaction of the present invention employing an enzyme or microorganism.

The term "biocatalyst," as used herein refers to an enzyme or mixture of enzymes that can be obtained from animals, plants, microorganisms, and the like. The enzyme or enzymes may be employed in any form such as in a purified form, a crude form, a mixture with other enzymes, a microbial fermentation broth, a fermentation broth, a microbial body, a filtrate of fermentation broth, and the like, either solely or in combination. In addition, the enzyme or microbial body may be immobilized, such as on a resin, or may be in solid form, such as in the form of a cross-linked enzyme crystal.

Furthermore, a "stereoselective process" is one that produces a particular stereoisomer of a reaction product in preference to other possible stereoisomers of that product. Enantioselectivity is generally quantified as "enantiomeric excess" (ee) defined as follows: $[\% \text{ enantiomeric excess } A(ee) = (\% \text{ enantiomer } A) - (\% \text{ enantiomer } B)]$, where A and B are the enantiomeric products formed from the starting materials.

The compounds of the present invention may have asymmetric carbon atoms. The carbon-carbon bonds of the compounds of the present invention may be depicted herein using a solid line (—), a solid wedge (), or a dotted wedge (). The use of a solid line to depict bonds to asymmetric carbon atoms is meant to indicate that all possible stereoisomers at that carbon atom are included. The use of either a solid or dotted wedge to depict bonds to asymmetric carbon atoms is meant to indicate that only the stereoisomer shown is meant to be included. It is possible that compounds of the invention may contain more than one asymmetric carbon atom. In those compounds, the use of a solid line to depict bonds to asymmetric carbon atoms is meant to indicate that all possible

41

-25-

stereoisomers are meant to be included. The use of a solid line to depict bonds to one or more asymmetric carbon atoms in a compound of the invention and the use of a solid or dotted wedge to depict bonds to other asymmetric carbon atoms in the same compound is meant to indicate that a mixture of diastereomers is present.

5 The term "treating," as used herein, means allowing at least two chemical reactants to come into contact with one another such that a chemical reaction or transformation can take place. For example, in the processes of the present invention, a compound of formula (II) may be treated with a chiral, non-racemic base to afford a salt as a product of a chemical reaction. In such reactions, the compound of formula (II) is said to be treated with the base.
10 Such reactions can occur in the solid phase, liquid phase, gas phase, in solution, or a combination of any of the foregoing depending on the identity of the reactants and their physical properties.

 The terms "separating" or "separated," as used herein, mean a process of physically isolating at least two different chemical compounds from each other. For example, if a
15 chemical reaction takes place and produces at least two products, (A) and (B), the process of isolating both (A) and (B) in pure form is termed "separating" (A) and (B).

 The term "hydrolyzed," as used herein, means a chemical reaction, which may be mediated by a biocatalyst according to the present invention, in which an ester, an amide, or both are converted into their corresponding carboxylic acid derivatives. For example, if a
20 reaction converts a compound of formula (I), wherein R^8 is other than hydrogen to a compound of formula (I) wherein R^8 is hydrogen, the compound of formula (I) is said to have been hydrolyzed.

 The term "converting," as used herein, means allowing a chemical reaction to take place with a starting material or materials to produce a different chemical product. For
25 example, if chemical reactants (A) and (B) are allowed to react with each other to produce product (C), starting materials (A) and (B) can be said to have "converted" to product (C), or it can be said that (A) was "converted" to (C), or that (B) was "converted" to (C). Furthermore, in the processes of the invention, salt forms of compounds of formula (I) are said to be "converted" to a compound of formula (I). In such cases, the term "converted" means that the
30 non-salt form of a compound of formula (I) was prepared from the corresponding salt form, usually by reaction with an appropriate acid, base, or combination of an acid and a base.

 Solutions of individual stereoisomeric compounds of the present invention may rotate plane-polarized light. The use of either a "(+)" or "(-)" symbol in the name of a compound of the invention indicates that a solution of a particular stereoisomer rotates plane-polarized light

42

-26-

In the (+) or (-) direction, as measured using techniques known to those of ordinary skill in the art.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 Diastereomeric mixtures can be separated into their individual diastereomers on the basis of their physical chemical differences by methods known to those skilled in the art, for example, by chromatography or fractional crystallization. Enantiomers can be separated by converting the enantiomeric mixtures into a diastereomeric mixture by reaction with an appropriate optically active compound (e.g., alcohol), separating the diastereomers and
10 converting (e.g., hydrolyzing) the individual diastereomers to the corresponding pure enantiomers. All such isomers, including diastereomeric mixtures and pure enantiomers are considered as part of the invention.

Alternatively, individual stereoisomeric compounds of the present invention may be prepared in enantiomerically enriched form by asymmetric synthesis. Asymmetric synthesis
15 may be performed using techniques known to those of skill in the art, such as the use of asymmetric starting materials that are commercially available or readily prepared using methods known to those of ordinary skill in the art, the use of asymmetric auxiliaries that may be removed at the completion of the synthesis, or the resolution of intermediate compounds using enzymatic methods. The choice of such a method will depend on factors that include,
20 but are not limited to, the availability of starting materials, the relative efficiency of a method, and whether such methods are useful for the compounds of the invention containing particular functional groups. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

When the compounds of the present invention contain asymmetric carbon atoms, the derivative salts, prodrugs and solvates may exist as single stereoisomers, racemates, and/or
25 mixtures of enantiomers and/or diastereomers. All such single stereoisomers, racemates, and mixtures thereof are intended to be within the scope of the present invention.

As generally understood by those skilled in the art, an optically pure compound is one that is enantiomerically pure. Preferably, an optically pure compound according to the present invention comprises at least 90% of a single stereoisomer (80% enantiomeric
30 excess), more preferably at least 95% (90% e.e.), even more preferably at least 97.5% (95% e.e.), and most preferably at least 99% (98% e.e.).

If a derivative used in the method of the invention is a base, a desired salt may be prepared by any suitable method known to the art, including treatment of the free base with an inorganic acid, such as hydrochloric acid; hydrobromic acid; sulfuric acid; nitric acid;
35 phosphoric acid; and the like, or with an organic acid, such as acetic acid; maleic acid;

183
23

-27-

5 succinic acid; mandelic acid; fumaric acid; malonic acid; pyruvic acid; oxalic acid; glycolic acid; salicylic acid; pyranosidyl acid, such as glucuronic acid or galacturonic acid; alpha-hydroxy acid, such as citric acid or tartaric acid; amino acid, such as aspartic acid or glutamic acid; aromatic acid, such as benzoic acid or cinnamic acid; sulfonic acid, such as p-toluenesulfonic acid or ethanesulfonic acid; and the like.

10 If a derivative used in the method of the invention is an acid, a desired salt may be prepared by any suitable method known to the art, including treatment of the free acid with an inorganic or organic base, such as an amine (primary, secondary, or tertiary); an alkali metal or alkaline earth metal hydroxide; or the like. Illustrative Examples of suitable salts include organic salts derived from amino acids such as glycine and arginine; ammonia; primary, secondary, and tertiary amines; and cyclic amines, such as piperidine, morpholine, and piperazine; as well as inorganic salts derived from sodium, calcium, potassium, magnesium, manganese, iron, copper, zinc, aluminum, and lithium.

15 In the case of derivatives, prodrugs, salts, or solvates that are solids, it is understood by those skilled in the art that the derivatives, prodrugs, salts, and solvates used in the method of the invention, may exist in different polymorph or crystal forms, all of which are intended to be within the scope of the present invention and specified formulas. In addition, the derivative, salts, prodrugs and solvates used in the method of the invention may exist as tautomers, all of which are intended to be within the broad scope of the present invention.

20 The compounds of the present invention that are basic in nature are capable of forming a wide variety of different salts with various inorganic and organic acids. Although such salts must be pharmaceutically acceptable for administration to animals, it is often desirable in practice to initially isolate the compound of the present invention from the reaction mixture as a pharmaceutically unacceptable salt and then simply convert the latter back to the free base compound by treatment with an alkaline reagent and subsequently convert the latter free base
25 to a pharmaceutically acceptable acid addition salt. The acid addition salts of the base compounds of this invention are readily prepared by treating the base compound with a substantially equivalent amount of the chosen mineral or organic acid in an aqueous solvent medium or in a suitable organic solvent, such as methanol or ethanol. Upon careful evaporation
30 of the solvent, the desired solid salt is readily obtained. The desired acid salt can also be precipitated from a solution of the free base in an organic solvent by adding to the solution an appropriate mineral or organic acid.

Those compounds of the present invention that are acidic in nature are capable of forming base salts with various pharmacologically acceptable cations. Examples of such
35 salts include the alkali metal or alkaline-earth metal salts and particularly, the sodium and

44

-28-

potassium salts. These salts are all prepared by conventional techniques. The chemical bases which are used as reagents to prepare the pharmaceutically acceptable base salts of this invention are those which form non-toxic base salts with the acidic compounds of the present invention. Such non-toxic base salts include those derived from such pharmacologically acceptable cations as sodium, potassium, calcium and magnesium, etc. These salts can easily be prepared by treating the corresponding acidic compounds with an aqueous solution containing the desired pharmacologically acceptable cations, and then evaporating the resulting solution to dryness, preferably under reduced pressure. Alternatively, they may also be prepared by mixing lower alkanolic solutions of the acidic compounds and the desired alkali metal alkoxide together, and then evaporating the resulting solution to dryness in the same manner as before. In either case, stoichiometric quantities of reagents are preferably employed in order to ensure completeness of reaction and maximum yields of the desired final product.

The activities of the enzymes used in this invention are expressed in "units". Units are defined as the rate of hydrolysis of p-nitrophenyl propionate per minutes as expressed in $\mu\text{mol/min}$ at room temperature.

Specific examples of the enzymes that may be used according to the present invention are those obtained from animal and plants such as cow liver esterase, pig liver esterase, pig pancreas esterase, horse liver esterase, dog liver esterase, pig phosphatase, amylase obtainable from barley and potato and lipase obtainable from wheat. Other examples are hydrolases obtained from such microorganisms as *Rhodotorula*, *Trichoderma*, *Candida*, *Hansenula*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Alkaligenes*, *Pediococcus*, *Klebsiella*, *Geotrichum*, *Lactobacillus*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Actinomyces*, *Enterobacter*, *Torulopsis*, *Corynebacterium*, *Endomyces*, *Saccaromyces*, *Arthrobacter*, *Metchnikowia*, *Pleurotus*, *Streptomyces*, *Proteus*, *Gliocladium*, *Acetobacter*, *Helminthosporium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Abidia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Penicillium* and *Schizophyllum* as well as from lichen and algae.

Specific examples of the microorganisms useful in the present invention include, but are not limited to, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus chinensis*, *Mucor pusillus*, *Aspergillus niger*, *Alkaligenes faecalis*, *Torulopsis erobii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Pediococcus acidilactici*, *Klebsiella pneumoniae*, *Abidia hyalosporea*, *Geotrichum*

-28-

candidum, Schizophyllum commune, Nocardia uniformis subtsuyanarens, Nocardia uniformis, Chromobacterium chocolateum, Hansenula anomala var. ciferrii, Hansenula anomala, Hansenula polymorpha, Achromobacter lyticus, Achromobacter parvulus, Achromobacter simplex, Torulopsis candida, Corynebacterium sepedonicum, Endomyces geotrichum, Saccaromyces carvisiae, Arthrobacter globiformis, Streptomyces griseus, Micrococcus luteus, Enterobacter cloacae, Corynebacterium ezui, Lactobacillus casei, Cryptococcus albidus, Pichia polymorpha, Penicillium frequentans, Aureobasidium pullulans, Actinomyces elegans, Streptomyces griseus, Proteus vulgaris, Gliocladium roseum, Gliocladium virens, Acetobacter aurantius, Helminthosporium sp. Chromobacterium indologenum, Chromobacterium violaceum, Flavobacterium lutescens, Metchnikowia pulcherrima, Pleurotus ostreatus, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium divercatum, Escherichia coli, Rodotulura minuta var. texensis, Trichoderma longibrachiatum, Mucor javanicus, Flavobacterium arborescens, Flavobacterium heparinum, and Flavobacterium capsulatum.

Exemplary, commercially available enzymes suitable for use in the present invention include lipases such as Amano PS-30 (*Pseudomonas cepacia*), Amano GC-20 (*Geotrichum candidum*), Amano APF (*Aspergillus niger*), Amano AK (*Pseudomonas* sp.), *Pseudomonas fluorescens* lipase (Biocatalyst Ltd.), Amano Lipase P30 (*Pseudomonas* sp.), Amano P (*Pseudomonas fluorescens*), Amano AY-30 (*Candida rugosa*), Amano N (*Rhizopus niveus*), Amano R (*Penicillium* sp.), Amano FAP (*Rhizopus oryzae*), Amano AP-12 (*Aspergillus niger*), Amano MAP (*Mucor melii*), Amano GC-4 (*Geotrichum candidum*), Sigma L-0382 and L-3126 (porcine pancreas), Lipase OF (Sepracor), Esterase 30,000 (Gist-Brocades), KID Lipase (Gist-Brocades), Lipase R (*Rhizopus* sp., Amano), Sigma L-3001 (Wheat germ), Sigma L-1754 (*Candida cylindracea*), Sigma L-0763 (*Chromobacterium viscosum*) and Amano K-30 (*Aspergillus niger*). Additionally, exemplary enzymes derived from animal tissue include esterase from pig liver, chymotrypsin and pancreatin from pancreas such as Porcine Pancreatic Lipase (Sigma). Two or more, as well as a single, enzyme may be employed when carrying out the process of the present invention.

The buffer medium may be inorganic acid salt buffers (e.g. potassium dihydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate), organic acid salt buffers (e.g. sodium citrate), or any other suitable buffer. The concentration of the buffer may vary from 0.005 to 2 M, preferably from 0.005 to 0.5 M and will depend on the specific subject compound and the enzymes or microorganism used.

A surfactant or mixture of surfactants may be added to the reaction mixture to solubilize the substrate. Examples of suitable surfactants include, but are not limited to, nonionic surfactants, such as alkylaryl polyether alcohols. One such surfactant that may be

46
46

-30-

used is octylphenoxy polyethoxyethanol, commercially available as Triton X-100 (from Sigma Chemical Company). An effective amount of a surfactant is used. The amount used can vary from 0.05% to about 10%, depending on factors such as, but not limited to, the identity of the reactant or reactants, the identity of the product or products, the solvents and/or cosolvents used, and the preferred method of isolating the desired product or products. Whether such a surfactant or surfactants are necessary, the choice of a particular surfactant, and the amount used, are all choices within the knowledge of one of ordinary skill in the art and can be determined without undue experimentation.

An amount of an organic solvent or mixture of solvents may be added to the reaction mixture to increase reactant or product solubility to facilitate the reaction. Examples of suitable solvents include, but are not limited to, acetonitrile, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxide, N,N-dimethylformamide, methyl alcohol, ethyl alcohol, and iso-propyl alcohol. Effective amounts of a co-solvent are from 1% to about 50% depending on the specific starting materials and enzymes and/or microorganism used. Whether such solvents are necessary, the identity of the solvent or solvents, and the amount of the solvent used are all choices within the knowledge of one of ordinary skill in the art and can be determined without undue experimentation.

The pH of the buffers or the pH of the reaction mixtures herein may be maintained from about 4 to about 10, from about 5 to about 9, or from about 7 to about 8. The reaction temperature may vary from about 0 to about 100 °C, and will depend on the identity of the starting materials, the biocatalyst used, and the solvent or mixture of solvents used. The reaction time is generally from 1 hour to 400 hours and will depend on the identity of the starting materials, the biocatalyst used, and the solvent or mixture of solvents used. Reaction progress may be monitored by an appropriate analytical method, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), reverse-phase HPLC, mass spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), or a combination of techniques, such as liquid chromatography/mass spectroscopy (LC/MS). The stereoselectivity of the reaction may be monitored or determined using techniques known to those of ordinary skill in the art, such as the use of HPLC with a chiral stationary phase. The conversion of starting materials may be carried to approximately 50%, after which the product acid and the unreacted starting material can be isolated.

The amount of enzyme used may vary from about 5 units to about 12,000 units of enzyme per mole of starting materials. The amount of a specific enzyme or mixture of enzymes required will depend on factors that include, but are not limited to, the temperature, the specific subject compound, the enzymes and/or microorganism used, and the desirable

-31-

reaction time. It may also be desirable to use an excess of the enzymes or the enzymes in some cases to afford a practically short reaction time, especially when the enzymes are immobilized and can be reused for many turnovers. The concentration of the ester substrate may be from 0.1 g/L to 100 g/L and depends on the specific subject compound and the enzyme and/or microorganism used.

The enzymes and/or microorganisms used in the present invention may be in crude form or in an immobilized form. They can be immobilized on various solid supports without loss of stereospecificity or change in stereo selectivity. The solid supports can be inert absorbents to which the enzyme is not covalently bonded. Instead the enzyme is absorbed such as by interactions of hydrophobic or hydrophilic portions of a protein with like regions of the inert absorbent, by hydrogen bonding, by salt bridge formation, or by electrostatic interactions. Inert absorbent materials include, but are not limited to, synthetic polymers (e.g. polystyrene, poly-(vinylalcohol), polyethylene and polyamides), mineralaceous compounds (e.g. diatomaceous earth and Fuller's earth), or naturally occurring polymers (e.g. cellulose). Specific examples of such materials include Celite 545 diatomaceous earth, Abelite XAD-8 polymeric resin beads and polyethylene glycol 8000.

The enzyme may also be immobilized on the support to which the enzyme is covalently bonded (e.g., oxirane-acrylic beads and glutaraldehyde activated supports). Specific examples include Eupergit C oxirane-acrylic beads and glutaraldehyde activated Celite 545. Other possible immobilizing systems are well known and are readily available to those skilled in the art of enzyme immobilization.

The desired products, the optically pure (or enriched) unreacted ester and the optically pure (or enriched) acid may be isolated from the hydrolysis mixture using conventional methods such as extractions, acid-base extractions, filtration, chromatography, crystallization or combinations thereof. The recovered enzyme or microorganism may be recycled and used in subsequent reactions with or without further manipulation or purification.

Methods for separating final reaction products from each other and from the reaction components include, but are not limited to, filtration, distillation, liquid chromatography, column chromatography, sublimation, crystallization, and derivatization followed by any of the above methods. Which method is chosen to effect the desired separation will depend on factors that include, but are not limited to, the identity of the reaction components, starting materials, and products. These choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art and can be made without undue experimentation.

In a convenient isolation procedure, after the enzymatic hydrolysis, the pH is adjusted to pH 7.5 to 8 (in the case of immobilized biocatalysts, the biocatalyst is first separated by

-32-

filtration), the product acid is separated from the unreacted ester by extracting the ester with an organic solvent such as methylene chloride, ethyl acetate, diethyl ether, methyl t-butyl ether, or any other solvent in which the substrate is soluble and stable. Concentration of the organic extracts affords the unreacted starting material. Concentration of the aqueous phase yields the product acid.

The acid can be freed of the buffer salts and enzyme by selective precipitation or chromatography or other methods known to those skilled in the art. These include acidifying the aqueous to about pH 3, or lower, and isolating the acid by extraction with an organic solvent such as methylene chloride, ethyl acetate, diethyl ether, methyl t-butyl ether, or any other solvent in which the acid is soluble and stable. Concentration of the organic extracts affords the unreacted starting material and the product acid, which can be purified and freed of the buffer salts and enzyme by selective precipitation or chromatography or other methods known to those of ordinary skill in the art.

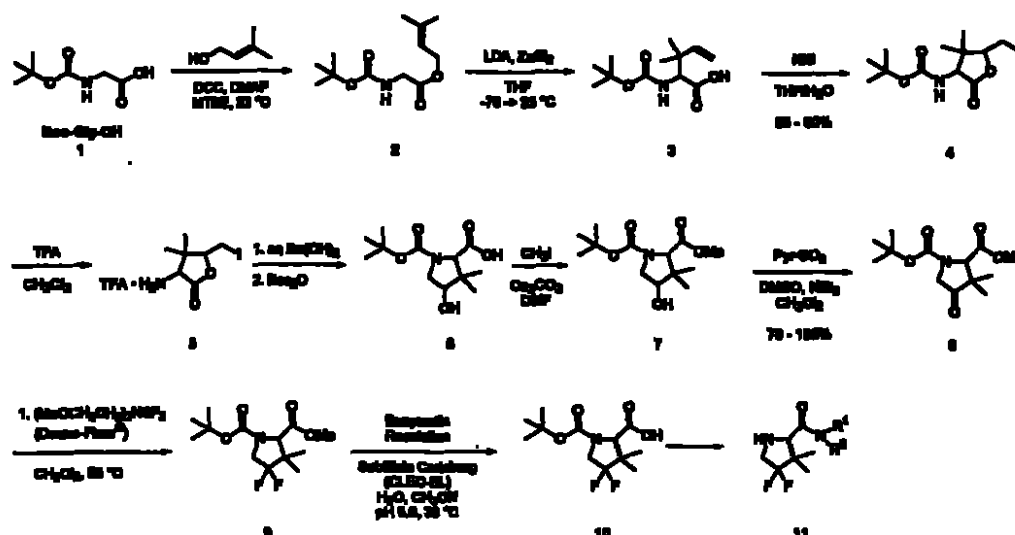
Either the unreacted, stereoisomerically enriched starting material or the stereoisomerically enriched product can be further racemized, if so desired. The unreacted, stereoisomerically enriched starting material can be racemized by methods known to those of ordinary skill in the art, such as heating in the presence of a base and in the presence of an appropriate solvent or solvents. The stereoisomerically enriched product can be further racemized by converting it to an ester and heating in the presence of a base and in the presence of an appropriate solvent. The stereoisomerically enriched product can be converted to an ester using methods known to those of skill in the art, such as by heating the product in the presence of an alcohol and an appropriate acid. In this manner, any stereoisomer of the compounds of formulas (I) and (II) can be obtained in stereochemically enriched form.

The compounds of formula (II) can be prepared according to Scheme I shown below.

119
29

-33-

Scheme 1



In general, one can begin with an N-protected glycine derivative, such as compound 1, which can be prepared from commercially available glycine according to methods known to those of ordinary skill in the art. The protected glycine derivative 1 can then be allowed to react with an agent or combination of agents that is capable of O-alkylating the terminal carboxyl group to afford compound 2. Examples of agents or combinations of agents that are known to O-alkylate a carboxyl group include, but are not limited to, alkyl halides, alkyl sulfonate esters, and alkyl trifluoromethane sulfonate esters. These reactions may be performed in the presence of a base that will not interfere with the desired transformation. Such bases include, but are not limited to, inorganic bases such as sodium carbonate and potassium carbonate, and organic bases such as triethylamine or pyridine.

Alternatively, N-protected glycine derivatives such as compound 1 may be allowed to react with an alcohol in the presence of an agent or combination of agents that will convert the -OH group into a suitable leaving group. Examples of such agents or combination of such agents include, but are not limited to, dicyclohexylcarbodiimide, diisopropylcarbodiimide, 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT), cyanuric chloride, 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU), carbonyldiimidazole (CDI), benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphate (BOP), 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU), and 3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one

-34-

(DEPBT). These reactions may be performed in the presence of optional additives. Suitable additives include, but are not limited to, hydroxybenzotriazole (HOBt), hydroxyazabenzotriazole (HOAt), N-hydroxysuccinimide (HOSu), N-hydroxy-5-norbornene-endo-2,3-dicarboximide (HONB), and 4-dimethylaminopyridine (DMAP). Whether these additives are necessary depends on the identity of the reactants, the solvent, and the temperature, and such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

In general, these reactions may be performed in a solvent that does not interfere with the reaction, for example alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, non-competitive alcohols, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. Additionally, water may be used as a co-solvent in this transformation if necessary. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -20 °C to 100 °C, depending on the specific reactants, solvents, and other optional additives used.

The O-alkylated glycine derivatives, such as compound 2, may also be prepared by reaction of the protected glycine derivatives with agents or a combination of agents that will convert the carboxylate into an acyl halide derivative, followed by reaction with an appropriate alcohol. For example, those compounds that contain an acyl chloride may be prepared from the protected glycine derivatives by reaction with agents such as thionyl chloride or oxalyl chloride. These reactions may be performed in the presence of a suitable base such as sodium carbonate, sodium bicarbonate, potassium carbonate, potassium bicarbonate, sodium hydroxide, potassium hydroxide, a trialkylamine, triethylamine for example, or a heteroaromatic base, pyridine for example. The resulting compounds may be isolated and then further reacted with an appropriate alcohol or they may be formed in situ and reacted with an appropriate alcohol without any isolation or further purification. These reactions may be performed in a solvent that does not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic

51
5

-35-

hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. Additionally, water may be used as a co-solvent in this transformation if necessary. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -20 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

The O-alkylated glycine derivatives, such as compound 2, may also be prepared from the carboxylate by reaction with an agent or combination of agents that converts the carboxylate group into an acyl imidazole, followed by reaction with an appropriate alcohol. Suitable agents for converting the carboxylate to an acyl imidazole include, but are not limited to, carbonyl diimidazole. The acyl imidazole intermediates may be isolated and then further reacted with an appropriate alcohol or they may be formed in situ and reacted with an appropriate alcohol without isolation or further purification. These reactions may be performed in a solvent that does not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. Additionally, water may be used as a co-solvent in this transformation if necessary. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -20 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen

-36-

will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

The racemic compounds of formula (II), such as compound 3 shown in Scheme 1, may be prepared from glycine derivatives that are O-alkylated with an allyl group or a derivative thereof, such as compound 2. Such O-alkylated glycine derivatives may be allowed to react with an agent or combination of agents such that the compound undergoes a Claisen-type rearrangement, to afford the compounds of formula (II). In general, these reactions may be performed in a solvent that does not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. Additionally, water may be used as a co-solvent in this transformation if necessary. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -78 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

In addition, such Claisen rearrangements may be promoted by first forming an enolate anion of the species that is to undergo the rearrangement. Such enolate anions can be prepared from the O-alkylated glycine derivatives by reaction with an agent or combination of agents that can function as a strong base. For example, the O-alkylated glycine derivatives can be allowed to react with lithium diisopropyl amide (LDA) to form the desired enolate anion. Such reactions may also be performed in the presence of additives that are known to promote such reactions, such as Lewis acids like zinc (II) chloride. In addition, such reactions can be performed in a solvent that will not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl

-37-

isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -78 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

Compounds of formula (I), such as compound 10 as shown in Scheme I, may be prepared from compounds of formula (II). In general, the compound of formula (II) may be allowed to react with an electrophilic halogenating agent to afford a lactone, such as 4. Suitable electrophilic halogenating agents include, but are not limited to, N-chlorosuccinimide (NCS), N-bromosuccinimide (NBS), and N-iodosuccinimide (NIS). These reactions may be performed in a solvent or mixture of solvents that does not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. In addition, water may be added to the reaction mixtures if so desired. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -78 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

The protected lactones, such as compound 4 in Scheme I, may be deprotected to provide alpha-amino lactones such as compound 5. Such deprotection reactions may be performed using methods known to those of ordinary skill in the art and as found in, for

-38-

example, Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley & Sons, New York, (1999).

The alpha-amino lactones, such as compound 5, may be allowed to react with an agent or combination of agents that allows the compound to undergo a rearrangement to afford a cyclic amine, such as compound 6 shown in Scheme I. In general, these reactions may be performed by allowing a compound such as 5 to react with an agent such as barium hydroxide. These reactions may be performed in a solvent or mixture of solvents that does not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers, alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. In addition, water may be added to the reaction mixtures if so desired. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -78 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

The cyclic amines, such as compound 6 may be isolated as the free carboxy amine, or they may be derivatized to facilitate isolation. For example, as shown in Scheme I, compound 6 was allowed to react with barium hydroxide in a mixture of water and an organic solvent to afford the desired cyclic amine. The cyclic amine was then allowed to react with (BOC)₂O to afford the BOC-protected amine, compound 7.

Cyclic amines, such as compound 6, may then be allowed to react with an agent or combination of agents that is capable of O-alkylating the carboxylate group to afford an ester, such as compound 7. Such agents were described earlier and include, but are not limited to, methyl iodide, methyl sulfonate ester, and methyl bromide. Such reactions may be performed in the presence of a compound that is capable of acting as a base. Suitable bases include, but are not limited to, cesium carbonate, potassium carbonate, and sodium carbonate. In addition, these reactions may be performed in a solvent or mixture of solvents that does not interfere with the desired transformation. Among suitable solvents are alkyl or aryl ethers,

-38-

alkyl or aryl esters, aromatic and aliphatic hydrocarbons, halogenated solvents, alkyl or aryl nitriles, alkyl or aryl ketones, aromatic hydrocarbons, or heteroaromatic hydrocarbons. For example, suitable solvents include, but are not limited to, ethyl acetate, isobutyl acetate, isopropyl acetate, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, dimethoxyethane, diisopropyl ether, chlorobenzene, dimethyl formamide, dimethyl acetamide, propionitrile, butyronitrile, t-amyl alcohol, acetic acid, diethyl ether, methyl-t-butyl ether, diphenyl ether, methylphenyl ether, tetrahydrofuran, 2-methyltetrahydrofuran, 1,4-dioxane, pentane, hexane, heptane, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, dichloromethane, chloroform, 1,2-dichloroethane, acetonitrile, benzonitrile, acetone, 2-butanone, benzene, toluene, anisole, xylenes, and pyridine, or any mixture of the above solvents. In addition, water may be added to the reaction mixtures if so desired. Furthermore, such reactions may be performed at temperatures from -78 °C to 100 °C. The specific reaction conditions chosen will depend on the specific subject compound and reagents chosen. Such choices are within the knowledge of one of ordinary skill in the art.

Compounds such as compound **Z** may be resolved or prepared in stereochemically-enriched form using the methods of the present invention. Alternatively, compounds such as **Z** may be used to prepare other compounds of formula (II) that may be resolved or prepared in stereochemically-enriched form according to the methods of the present invention. For example, the secondary hydroxyl group in compound **Z** may be oxidized to afford the corresponding ketone **g**, shown in Scheme 1. Such oxidations may be performed by methods known to those of ordinary skill in the art, such as oxidation using PCC, under Swern conditions, or using pyr-SO₂/DMSO/NEt₃. Compounds such as **g** may be resolved or prepared in stereochemically-enriched form using the methods of the present invention. Alternatively, such compounds may be used to prepare other analogs that may themselves be resolved or prepared in stereochemically enriched form using the methods of the present invention.

For example, ketones such as compound **g** may be allowed to react with an agent or combination of agents that is capable of converting the ketone functional group into a dihalo methylene moiety, such as a -CF₂- group. Such reactions may be performed using agents or combinations of agents known to those of ordinary skill in the art, such as (diethylamino)sulfur trifluoride (DAST), and others. For example, reaction of compound **g** with (MeOCH₂CH₂)₂NSF₃ (sold as Deoxo-Fluor® by Air Products, Inc.) in dichloromethane and at 55 °C, afforded the difluoro compound **g**.

Compounds such as **g** can be resolved or prepared in stereochemically-enriched form using the methods of the present invention. As shown in Scheme 1, reaction of a

26
50

-40-

racemic mixture of compound **9** with the enzyme Subtilisin Carlsberg in a mixture of acetonitrile and water at a pH of 8, and at 30 °C, provided stereochemically enriched compound **10**. Compounds such as **10** that contain a nitrogen-protecting group can be further manipulated by removing the protecting group to afford secondary, cyclic amines such as compound **11** shown in Scheme I.

Alternatively, compounds such as **6**, **7**, **8**, **9**, and **10**, as shown in Scheme I, can be prepared in stereochemically enriched form by resolving or preparing precursor compounds, such as compound **3** shown in Scheme I, in stereochemically enriched form. After resolving or preparing compounds such as **3** in stereochemically enriched form, they can be used as shown to prepare product compounds that are themselves stereochemically enriched.

Compounds of formula (I), wherein Z is O or S, can be prepared according to methods known to those of skill in the art. For example, see Mimoto, T. et al. J. Med. Chem. 1999, **42**, 1789; EP 0751145; U.S. Pat. Nos. 5,644,028, 5,932,650, 5,982,640, 5,932,550, and 6,222,043, H. Hayashi et al., J. Med. Chem. 1999, **42**, 1789; and PCT Publication No. WO 01/06230 A1, which are hereby incorporated by reference.

EXAMPLES

The examples below are intended only to illustrate particular embodiments of the present invention and are not meant to limit the scope of the invention in any manner.

In the examples described below, unless otherwise indicated, all temperatures in the following description are in degrees Celsius (°C) and all parts and percentages are by weight, unless indicated otherwise.

Various starting materials and other reagents were purchased from commercial suppliers, such as Aldrich Chemical Company or Lancaster Synthesis Ltd., and used without further purification, unless otherwise indicated.

The reactions set forth below were performed under a positive pressure of nitrogen, argon or with a drying tube, at ambient temperature (unless otherwise stated), in anhydrous solvents. Analytical thin-layer chromatography was performed on glass-backed silica gel 60°F 254 plates (Analtech (0.25 mm)) and eluted with the appropriate solvent ratios (v/v).

The reactions were assayed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) or thin-layer chromatography (TLC) and terminated as judged by the consumption of starting material. The TLC plates were visualized by UV, phosphomolybdic acid stain, or iodine stain.

¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker instrument operating at 300 MHz and ¹³C-NMR spectra were recorded at 75 MHz. NMR spectra are obtained as DMSO-d₆ or CDCl₃ solutions (reported in ppm), using chloroform as the reference standard (7.25 ppm and 77.00

-41-

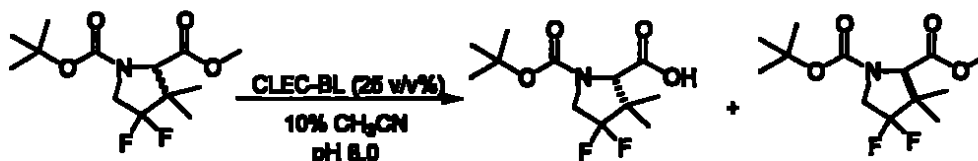
ppm) or DMSO- d_6 (2.50 ppm and 39.52 ppm)). Other NMR solvents were used as needed. When peak multiplicities are reported, the following abbreviations are used: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br = broadened, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets. Coupling constants, when given, are reported in Hertz.

5 Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer as neat oils, as KBr pellets, or as $CDCl_3$ solutions, and when reported are in wave numbers (cm^{-1}). The mass spectra were obtained using LC/MS or APCI. All melting points are uncorrected.

All final products had greater than 95% purity (by HPLC at wavelengths of 220nm and 254nm).

10 In the following examples and preparations, "Et" means ethyl, "Ac" means acetyl, "Me" means methyl, "Ph" means phenyl, $(PhO)_2POCl$ means chlorodiphenylphosphate, "HCl" means hydrochloric acid, "EtOAc" means ethyl acetate, " Na_2CO_3 " means sodium carbonate, "NaOH" means sodium hydroxide, "NaCl" means sodium chloride, " NEt_3 " means triethylamine, "THF" means tetrahydrofuran, "DIC" means diisopropylcarbodiimide, "HOBt" means hydroxy
15 benzotriazole, " H_2O " means water, " $NaHCO_3$ " means sodium hydrogen carbonate, " K_2CO_3 " means potassium carbonate, "MeOH" means methanol, "i-PrOAc" means isopropyl acetate, " $MgSO_4$ " means magnesium sulfate, "DMSO" means dimethylsulfoxide, "AcCl" means acetyl chloride, " CH_2Cl_2 " means methylene chloride, "MTBE" means methyl t-butyl ether, "DMF" means dimethyl formamide, " $SOCl_2$ " means thionyl chloride, " H_3PO_4 " means phosphoric acid,
20 " CH_3SO_3H " means methanesulfonic acid, " Ac_2O " means acetic anhydride, " CH_3CN " means acetonitrile, and "KOH" means potassium hydroxide.

Example 1: Preparation of (2S)-4,4-difluoro-3,3-dimethyl-N-Boc-proline



25 To a 50 L Reactor equipped with a pH electrode, an overhead stirrer, a heating coil and a base addition line (718 Stat Titro-Metrohm pH titrator, Brinkman Instruments, Inc.), was added the alkaline protease from *Bacillus licheniformis*, (Subtilisin Carlsberg, purchased from Altus as CLEC-BL as a 6-14 % w/v solution) (7 L of fresh CLEC + 5L recycled CLEC (80 % of the initial activity) and 24 L of di-water). The pH of the suspension was adjusted to 8.0
30 by addition of 20 mL of 2N NaOH. A solution of the racemic ester (400 g, 1.36 mol, 1.00 eq, in acetonitrile, 3.6 L) was added to the suspension and the mixture was stirred at 30 °C for 262 h. During the reaction time, the pH of the solution was monitored and was maintained at

-42-

pH 8.0 by the periodic addition of 2N NaOH (a total of 248 mL of base were added during the 262 h reaction time). Reaction progress was monitored using reverse-phase HPLC. The reaction was stopped after it had been determined that 45-50 % starting material had been consumed. The enantiomeric excess (% ee) of the acid was determined to be 95.5 %. The reaction mixture was extracted MTBE (3x with 16 L), and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to afford 220 g of crude scalemic ester I, (R)-enriched. The remaining aqueous slurry was filtered (to remove the CLEC-BL) through Whatman paper 1. The CLEC paste was removed from the paper and stored at 4 °C for later use, if desired. The remaining aqueous solution was acidified to pH 5.5 with 1N hydrochloric acid and extracted with MTBE (2 x 16 L each). The aqueous solution was again extracted, at pH 5.0 and at pH 4.0. The organic fractions containing product acid were pooled, and concentrated with vacuum to afford a solid residue. The residue was suspended in hot water (40 – 50 °C, 1000 mL) and allowed to cool to room temperature overnight. The resulting slurry was filtered and the crystals dried in a vacuum oven at 40 °C overnight to afford the acid as a white solid (133 g, 98 % ee, 69.8 % yield for kinetic resolution, >98 % HPLC pure). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.9 (bs, 1H), 4.10 (d, 1H), 3.89 (dd, 2H), 1.5 (s) + 1.45 (s) (9H), 1.3 (s, 3H), 1.15 (s, 3H).

The following analytical methods were used to monitor reaction progress and measure the % ee and purity of the final product:

20 Non-chiral HPLC:

Detector wavelength: 200 nm

Column: Luna C-18, 4.6 x 30 mm

Column temperature: 35 °C

Flow rate 1.5 mL/min

25 Injection volume: 10 µL

Mobile Phases: A: 25 mM KH₂PO₄ pH 2.6; B: Acetonitrile

Run: gradient: 35 to 70 % B in 5 min, 2 min post run

Retention times: Acid 1.63; Ester 3.28

Chiral HPLC:

30 Detector wavelength: 195 nm

Column: Chiralcel OJ-R, 3µm, C-18, 4.6 x 150 mm

Column temperature: 40 °C

Flow rate 0.5 mL/min

Injection volume: 10 µL

35 Mobile Phases: A: 25 mM KH₂PO₄ pH 2.0; B: Acetonitrile; C: HPLC H₂O

54
59

-43-

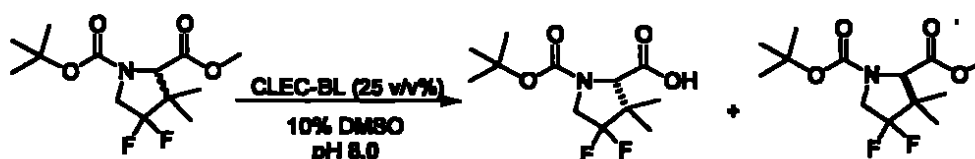
Run: Isocratic: 75 % A and 25 % B for 17 min, then 75 % B and 25 % C for 3 min, and finally, 75 % A and 25 % B for 15 min

Retention times: Acid 14.85(R) and 15.84 (S)

Sample preparation

- 6 Two samples were taken each time sampling was performed. Every sample was prepared by mixing 10 mL from the reaction mixture and 10 mL acetonitrile. The solution was vortexed and layers were separated by centrifugation on a Beckman microfuge. 100 μ L of the upper layer were further diluted with 400 μ L of acetonitrile and injected into the HPLC.

10 Example 2: Preparation of (2S)-4,4-difluoro-3,3-dimethyl-N-Boc-proline



- A solution of racemic ester (3g, 10.23 mmol, 1.00 eq in DMSO, 15 mL) and 50 mM TRIS buffer at pH 8 (97.5 mL) were added to a 250 mL 3-neck flask equipped with a temperature probe, a stirring bar, a pH electrode and a base addition line. The pH of the mixture was approximately 7.64. The alkaline protease from *Bacillus licheniformis*, (Subtilisin Carlsberg, purchased from Altus as CLEC-BL as a 6-14 % w/v solution) (37.5 mL) was then added. After addition of the enzyme, the pH of the mixture was approximately 7.70. The resulting mixture was slowly heated to 40 °C using a heating mantle. The pH of the mixture was adjusted to pH 8.0 by the addition of 1 N sodium hydroxide (0.848 mL). As the reaction progressed, the pH of the reaction mixture was monitored and maintained at pH 8 by the periodic addition of 1 N sodium hydroxide (a total of 17.7 mL of 1N NaOH were added). The resulting suspension was stirred at 40 °C for a total of 121 h. Reaction progress was monitored by reverse-phase HPLC monitoring both conversion and % ee of the product. The reaction was stopped after HPLC analysis indicated that 43 % of the starting material had been consumed. The % ee of the acid was measured as 94.6 % ee.

- The resulting mixture was extracted MTBE (three x 75 mL each) and the combined organic layers were filtered through Whatman paper number 1 to remove emulsified particulates and to better distinguish the aqueous-organic boundary. The aqueous layer associated with the emulsion was added back to the mother liquor. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to afford 1.74 g of crude racemic ester I, (R)-enriched.

-44-

The remaining aqueous slurry was filtered (to remove the CLEC-BL) through Whatman paper 1. The CLEC-BL paste was removed from the paper and stored at 4 ° C for later use, if desired. The remaining aqueous solution was acidified to pH 5.3 using 1 N HCl and extracted with 80 mL MTBE. The extraction was repeated five times with the pH reduced to 5.3, 4.8, 4.0, and 3.9, respectively in the subsequent four extractions. The organic layers containing acid were pooled, dried over Na₂SO₄, and concentrated with vacuum to obtain 1.480 g of crude acid. The solid residue was then resuspended in 150 mL MTBE. The acid was washed twice with 75 mL of 10 mM potassium phosphate buffer at pH 4.2 – 4.5 to remove DMSO. The organic layer was dried with Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to afford the acid as a white solid (0.831 g, 98 % ee, 58% yield for kinetic resolution, >98 % HPLC pure). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.3 (bs, 1H), 4.15 (d, 1H), 3.89 (dd, 2H) 1.6 (s) + 1.45 (s, 9H), 1.3 (s, 3H) 1.15 s, 3H).

The following analytical methods were used to monitor reaction progress and measure the % ee and purity of the final product:

16 Non-chiral HPLC:

Detector wavelength: 200 nm

Column: Luna C-18, 4.6 x 30 mm

Column temperature: 35 °C

Flow rate 1.5 mL/min

20 Injection volume: 10 µL

Mobile Phases: A: 25 mM KH₂PO₄ pH 2.5; B: Acetonitrile

Run: gradient: 35 to 70 % B in 5 min, 2 min post run

Retention times: Acid 1.83; Ester 3.28

Chiral HPLC:

25 Detector wavelength: 195 nm

Column: Chiralcel OJ-R, 300m, C-18 4.6 x 150 mm

Column temperature: 40 °C

Flow rate 0.5 mL/min

Injection volume: 10 µL

30 Mobile Phases: A: 25 mM KH₂PO₄ pH 2.0; B: Acetonitrile; C: HPLC H₂O

Run: Isocratic: 75 % A and 25 % B for 17 min, then 75 % B and 25 % C for 3 min, and finally, 75 % A and 25 % B for 15 min

Retention times: Acid 14.85(R) and 15.84 (S)

Sample preparation:

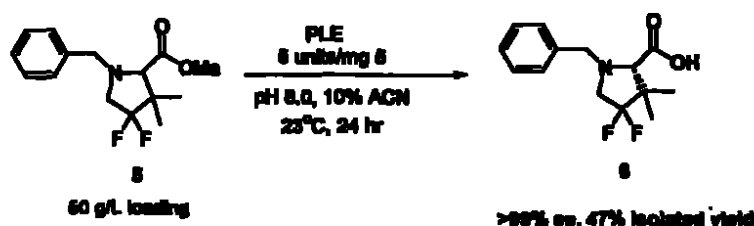
61
61

-45-

Two samples were taken each time sampling was performed. Each sample was prepared by diluting 100 μ L of the reaction mixture with 1.9 mL acetonitrile. The solution was vortexed and 1 mL of this solution was centrifuged on a Beckman microfuge. The upper layer was injected into HPLC.

5

Example 3: Resolution of N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester



To N-tert-butoxycarbonyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester (5.0 g, 17.0 mmol) was added 4M HCl (2.0 eqv, 8.5 mL) in dioxane. The mixture was stirred at 0 °C for 3 h. After the reaction was judged to be complete by HPLC, the dioxane and excess HCl were removed in vacuo to afford a crude residue. The crude residue was washed by MTBE (3 mL x 2) and dried in oven to provide 3.8 g solid 4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester (~95% purity), which was used in the next reaction without any further purification.

To 3.8 g of 4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester was added K_2CO_3 (3.8 g), MeOH (60 mL), and BnBr (1.1 eqv, 2.55 mL). The resulting mixture was stirred at 23 °C for 20 h. The mixture was filtered and the solvents were removed under vacuum, leaving a residue. The residue was dissolved in MTBE (60 mL) and was washed with 1N HCl (20 mL x 3), $NaHCO_3$ (20 mL x 3) and brine (20 mL x 1). The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , and the solvents were removed under vacuum to afford 4.3 g (90% yield) of N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester.

The racemic ester (3.0 g, 10.6 mmol) was dissolved in acetonitrile (8 mL, 15%) and potassium phosphate buffer (pH 8.0, 0.1 M, 60 mL) was added. Pig Liver esterase (750 mg, 10~15 units/mg) was added and the pH of the solution was maintained at pH 8 by the periodic addition of 1N NaOH.

Reaction progress was monitored by reverse-phase HPLC. After 20~24 h, ~50% conversion was reached and the pH of the mixture was adjusted to pH 8.3-8.4 by the addition of 1N NaOH and the solution was extracted with MTBE (40 mL x 3). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and was concentrated to afford the remaining R-ester S (1.58 g, ~52%).

The pH of the remaining aqueous layer was adjusted to pH 3.5 by the addition of 1N HCl and

30

82
62

-46-

was extracted with MTBE (40 mL x 3). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , and the solvents were removed under vacuum to afford N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline (1.35 g, 47%).

4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester: ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ 184.1. ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 4.48 (s, 1H), 3.77-3.98 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.04 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 ppm, D_2O) δ 167.70, 66.43, 66.38, 54.52, 48.59, 45.94, 17.64, 17.02.

N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester: ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ 284.1. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.23-7.40 (m, 5H), 3.94 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.48 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.35 (dd, $J = 10.6, 20.0$ Hz, 1H), 2.85 (ddd, $J = 6.6, 11.4, 18.3$ Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.07 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 ppm, CDCl_3) δ 171.42, 138.20, 128.87, 128.73, 127.73, 74.18, 58.72, 51.98, 47.06, 33.82, 20.16, 18.96.

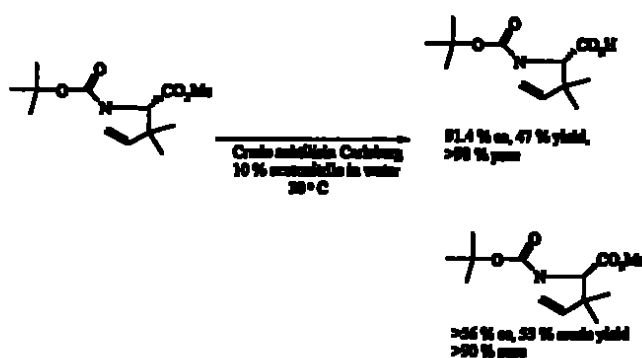
N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline: ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$ 268.1. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.26-7.40 (m, 5H), 3.94 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 3.66 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 3.32-3.57 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.11 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 ppm, CDCl_3) δ 171.10, 136.19, 129.16, 128.68, 127.73, 74.83, 60.67, 56.48, 53.75, 48.48, 20.40, 18.77.

The following analytical methods were used:

N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline methyl ester: Chiralcel AD-RH (4.6 x 100 mm, 3 μm); flow rate: 0.6 mL/min; injection volume: 5 μL ; mobile phases: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (20:80), detection at 254 nm.

N-benzyl-4,4-difluoro-3,3-dimethylproline: Chiralcel OD-RH (4.6 x 100 mm, 3 μm); flow rate: 0.6 mL/min; injection volume: 5 μL ; mobile phases: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40), detection at 254 nm.

Example 4: Preparation of (S)-3,3-dimethyl-N-Boc-vinylglycine



-47-

To a 5 L three neck flask equipped with a pH electrode, an overhead stirrer, a heating mantle and a base addition line, was added the racemic ester I (78 g, 0.3 mol, 1.00 eq) in acetonitrile (280 mL).

5 In a separate container were added Alcalase (350 mL of a solution that was passed through a tangential filtration system and concentrated to one fifth of the original volume) and distilled water (2.8 L). The pH of the resulting solution was adjusted to pH 7.0. The enzyme solution was added to flask containing the ester solution. The resulting suspension was stirred at 30 °C for 51 h, during which time the pH of the solution was maintained at 7.0 by the periodic addition of 1N NaOH (a total of 95.8 mL of base added over the 51 h). Reaction
10 progress was followed by reverse-phase HPLC and the reaction was stopped after it was determined that 45 % of the starting material had been consumed.

The mixture was extracted with MTBE (3x 1.75 L each), and the combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford 50.81 g of crude racemic ester I, (R)-enriched (>55 % yield, approx. 58 % ee). This crude mixture contained
15 some carboxylic acid < 7 %, which was recovered later by acid-base extraction. The remaining aqueous solution was passed through a Pellicon 2 tangential flow filtration equipped with an Ultracel cellulose membrane. The remaining solution was acidified to pH 4.0 and extracted with MTBE (3 x 1.75 L). The fractions containing the acid were pooled, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to afford a pale yellow oil (31 g,
20 91.4 % ee, 42 % yield, >98 % HPLC pure). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.69 (s, 1H), 5.78 (dd, 2H), 5.02 (m, 2H), 4.98 (s, 1H), 4.09 (d, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.06 (s, 6H).

The following analytical conditions were used:

Non-chiral HPLC

Detector wavelength: 200 nm
25 Column: Luna C-18, 4.6 x 30 mm
Column temperature: 35 °C
Flow rate 1.5 mL/min
Injection volume: 10 µL
Mobil Phases: A: 25 mM KH₂PO₄ pH 2.6; B: Acetonitrile
30 Run: gradient: 30 to 70 % B in 5 min, 2 min pre run
Retention times: Acid 1.63; Ester 3.28

Chiral HPLC

Detector wavelength: 200 nm
Column: Chiralcel OJ-R, 3µm, C-18 4.6 x 100 mm
35 Column temperature: not controlled

-48-

Flow rate 0.5 mL/min

Injection volume: 10 μ LMobile Phases: A: 25 mM NaH_2PO_4 pH 2.0; B: Acetonitrile

Run: Isocratic: 25 % B for 55 min, 3 min post run

5 Retention times: Acid 16.33 (R) and 17.97 (S); Ester 50.40 (S), 51.30(R)

Method to analyze ee of pure ester:

Column: Chiralcel OD-RH, 150 x 4.6 mm

Flow rate: 0.8mL/min

10 Temperature: 30 °C degree

Mobile phase: 30% ACN and 70% H_2O

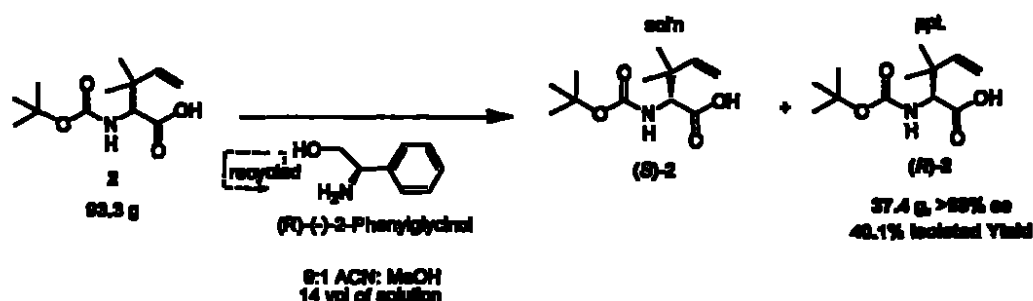
Wavelength: 205 nm

Sample preparation:

Sample preparation:

15 Two samples were taken each time sampling was performed. Every sample was made by taking 2x200 μ L from the reaction mixture, diluted with 1 mL of ethyl acetate and 100 μ L of 1N HCl, then vortexed and layers separated by centrifugation on a Beckmann microfuge. 100 μ L of the upper layer (organic) were further diluted with 400 μ L of acetonitrile/water(1:1) and injected into HPLC.

20

Example 5: Preparation of (R)-3,3-dimethyl-N-Boc-vinylglycine

25

To a 2000 mL jacketed flask equipped with an overhead stirrer was added the racemic acid 2, 3,3-dimethyl-N-Boc-vinylglycine, (93.3 g, 386.2 mmol, 1.00 eq), (R)-phenylglycinol (52.6g, 386.2 mmol, 1.00 eq), methanol (200 mL) and acetonitrile (1800 mL). The resulting slurry was stirred and heated to 70-80 °C until the solution became homogeneous. The solution was allowed to slowly cool to room temperature with continuous

65
65

-49-

stirring, resulting in crystallization. The resulting slurry was filtered and the crystalline salt (containing the desired (R)-enantiomer) was washed with 100 mL of cold acetonitrile, collected and analyzed by HPLC. In cases where it is desired to improve the % ee of the resulting product after the 1st crystallization, a second crystallization can be performed.

- 5 The salt was then converted to the free acid by dissolving the salt in 250 mL of ethyl acetate (alternatively, MTBE can be used in place of ethyl acetate). Water (250 mL) was then added and the pH of the resulting solution was adjusted to pH 3 by the addition of 1N hydrochloric acid. The organic layer was separated and the aqueous phase was again extracted with ethyl acetate (200 mL). The extracts were combined, dried over sodium sulfate, and concentrated under vacuum to afford a clear oil that was dried overnight under vacuum to afford a white solid (37.4 g, >98 % ee, 40.1% isolated overall yield, >98 % pure).
- 10

Recycling (R)-Phenylglycinol:

- The pH of the aqueous layer from the previous step was adjusted to pH 8.0 by the addition of 1N sodium hydroxide and the solution was extracted with 300 mL of Ethyl Acetate (or MTBE). The extract was then dried with sodium sulfate and concentrated under vacuum. The product was isolated as white crystals (12.3g, >98 % pure, note that recovery was only from 40% of material, the remaining recrystallizing agent can be recovered from the filtrate generated in step 4).
- 15

 The following analytical methods were used:

20 Chiral HPLC Conditions

Detector wavelength: 205 nm

Column: Chiralcel OJ-RH, 3 μ , C-18 4.6 x 100 mm

Column temperature: 30 °C

Flow rate 0.6 mL/min

25 Injection volume: 10 μ L

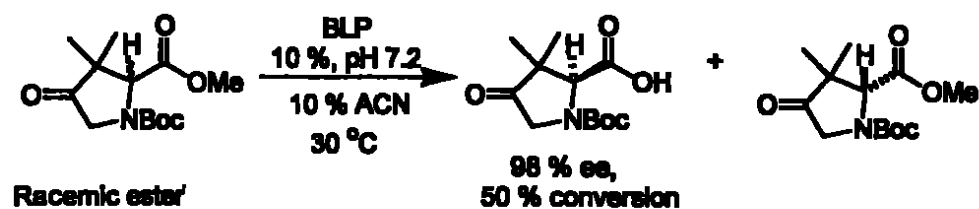
Mobil Phases: A: Acetonitrile (0.1% TFA): B: 75% H₂O (0.1% TFA)

Run: Isocratic: 25% A: 75% B 18 min

Retention times: Acid: 11.69 (R) and 12.9 (S) / 5.3 R-phenyl glycinol

30 Example 6: Preparation of (2S)-4-oxo-3,3-dimethyl-N-Boc-proline

-50-

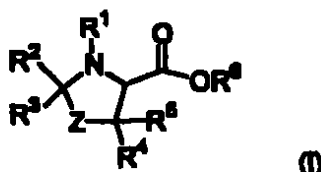


10 mg of the racemic ester was suspended in 100 microliters of acetonitrile and was added to
6 900 mL of KPB buffer containing 10% *Bacillus lentus* protease (BLP). The reaction was
stopped after 16 h, resulting in a 50% conversion and >98% ee of the acid product (2S)-4-
oxo-3,3-dimethyl-N-Boc-proline. Amano prolester FGF was another candidate, which was
found to carry out this reaction with similar enantioselectivities and reactivity.

-61-

We claim:

1. A method of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (I),



5 wherein:

Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸);

R¹ is hydrogen, -(CR⁷R⁸)_t(C₆-C₁₄ aryl), -CH₂CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, -C(O)C(O)OR⁷, or -Si(R⁷)₃, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);

10 R² and R³ are independently chosen from hydrogen, C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁷R⁸)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁷R⁸)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);

15 R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁷R⁸)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁷R⁸)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);

R⁶ is hydrogen;

20 each R⁷ and R⁸ is independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁸R⁹)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁸R⁹)_t(4-10 membered heterocyclic), wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁸, and -N(R⁸R⁹);

each R⁹ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl; and

t is an integer from 0 to 5;

25 said method comprising:

30 treating a compound of formula (I), wherein R¹, R², R³, R⁴ and R⁵ are as defined above and R⁶ is chosen from C₁-C₁₀ alkyl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, -(CR⁷R⁸)_t(C₆-C₁₄ aryl), and -(CR⁷R⁸)_t(4-10 membered heterocyclic), and wherein said C₆-C₁₄ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸), with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

7
10
60

-52-

2. A method according to claim 1, wherein in the compound of formula (I):
 Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸);
 R¹ is -(CH₂)(C₆-C₁₄ aryl), -CH₂CH=CH₂, -C(O)OR⁷, or -C(O)C(O)OR⁷, wherein said
 5 C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀
 alkyl, -OR⁷, and -N(R⁷R⁸);
 R² and R³ are independently chosen from hydrogen, methyl, ethyl, butyl, and pentyl;
 R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen, halo, methyl, ethyl, butyl, and
 10 pentyl;
 R⁶ is hydrogen;
 R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, halo, C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkoxy,
 C₂-C₁₀ alkenyl, and C₆-C₁₄ aryl, wherein said C₆-C₁₄ aryl is optionally substituted with at least
 one substituent chosen from halo, C₁-C₁₀ alkyl, -OR⁸, and -N(R⁸R⁹); and
 each R⁹ is independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl.
- 15 3. A method according to claim 1, wherein in the compound of formula (I):
 Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸);
 R¹ is -CH₂Ph, -C(O)OR⁷, or -C(O)C(O)OR⁷;
 R² and R³ are hydrogen;
 20 R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen and methyl;
 R⁶ is hydrogen; and
 R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen and C₁-C₁₀ alkyl.
- 25 4. A method according to claim 1, wherein in the compound of formula (I):
 Z is O, S, C=O, C=CH₂, or -(CR⁷R⁸);
 R¹ is -CH₂Ph, -C(O)OCH₃, -C(O)OC(CH₃)₃, or -C(O)C(O)OCH₃;
 R² and R³ are hydrogen;
 R⁴ and R⁵ are independently chosen from hydrogen and methyl;
 R⁶ is hydrogen; and
 30 R⁷ and R⁸ are independently chosen from hydrogen, fluorine, methyl, and -OCH₃.
5. A method according to claim 1, wherein in the compound of formula (I):
 Z is S;
 35 R¹ is -CH₂Ph, -C(O)OCH₃, -C(O)OC(CH₃)₃, or -C(O)C(O)OCH₃;

-63-

R^1 and R^2 are hydrogen;
 R^4 and R^5 are methyl; and
 R^6 is hydrogen.

5

6. A method according to claim 1, wherein in the compound of formula (I):

Z is $-(CR^7R^8)-$;

R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, or $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$;

R^2 and R^3 are hydrogen;

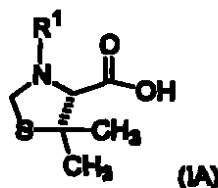
10 R^4 and R^5 are independently chosen from hydrogen and methyl, ethyl, butyl and pentyl;

R^6 is hydrogen; and

R^7 and R^8 are independently chosen from hydrogen, fluorine, chlorine, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, and $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkoxy.

15

7. A method of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IA),



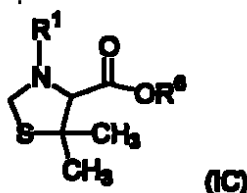
wherein:

R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, or $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$; and

20 R^7 is $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl;

said method comprising:

treating a compound of formula (IC),

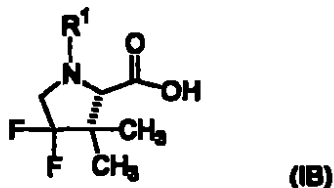


25 wherein R^1 is as defined above and R^6 is chosen from $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ alkenyl, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ alkynyl, $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-\text{CH}_2(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^8)$, with a biocatalyst in an aqueous solution,

-54-

an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

8. A method of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IB),



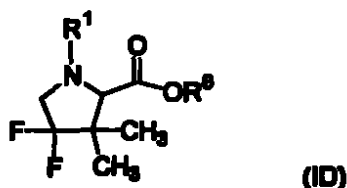
wherein:

R^1 is $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, or $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$; and

R^7 is $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl;

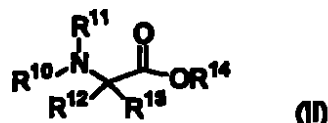
said method comprising:

10 treating a compound of formula (ID),



wherein R^1 is as defined above and R^8 is chosen from $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ alkenyl, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ alkynyl, $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, and $-\text{CH}_2(4\text{-}10 \text{ membered heterocyclic})$, and wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $-\text{OR}^7$, and $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^7)$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

20 9. A method of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (II),



wherein:

R^{10} is hydrogen, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{15})(\text{C}_6\text{-C}_{14} \text{ aryl})$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{16}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{16}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^{16}$, or $-\text{Si}(\text{R}^{15})_2$, wherein said $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $-\text{OR}^{16}$, and $-\text{N}(\text{R}^{16}\text{R}^{16})$;

-65-

R^{11} is hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})(C_6-C_{14}$ aryl), or $-(CR^{15}R^{16})(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{16}$, and $-N(R^{15}R^{16})$;

5 R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^{15}R^{16})(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{16}$, and $-N(R^{15}R^{16})$, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

10 R^{14} is hydrogen;

R^{15} and R^{16} are independently chosen from hydrogen, halo, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^{17}R^{17})(4-10$ membered heterocyclic), wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17})$;

each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and

t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

20 treating a compound of formula (II), wherein R^{10} , R^{11} , R^{12} , and R^{13} are as defined above, and R^{14} is chosen from C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})(C_6-C_{14}$ aryl), and $-(CR^{15}R^{16})(4-10$ membered heterocyclic), and wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{16}$, and $-N(R^{15}R^{16})$, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is
25 selectively hydrolyzed.

10. A method according to claim 9, wherein in the compound of formula (II):

R^{10} is $-C(O)OR^{18}$ or $-C(O)C(O)OR^{18}$;

R^{11} is hydrogen or C_1-C_{10} alkyl;

30 R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, and C_2-C_{10} alkynyl, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

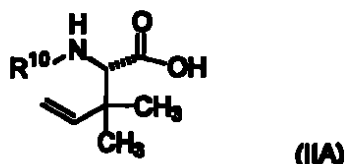
R^{14} is hydrogen; and

R^{16} is C_1-C_{10} alkyl.

35 11. A method of preparing a stereoisomerically enriched compound of formula (IIA),

22
x2

-58-



wherein:

R^{10} is chosen from hydrogen, $-(CR^{15}R^{16})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^{18}$, $-C(O)OR^{18}$, and $-C(O)C(O)OR^{18}$; and

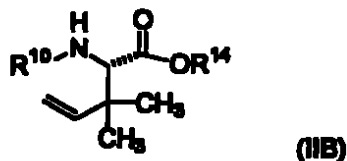
5 each R^{15} and R^{16} are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17'})_t(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{17}R^{17'})_t(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17'})$;

10 each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and

t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

treating a compound of formula (IIB),



15

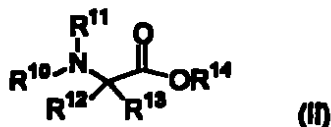
wherein R^{10} is as defined above, and R^{14} is C_1-C_{10} alkyl, with a biocatalyst in an aqueous solution, an organic solvent, or a mixture of organic and aqueous solvents wherein at least one stereoisomer is selectively hydrolyzed.

20 12. A method according to any one of claims 1 to 11, wherein said biocatalyst is chosen from an alkaline protease, an esterase, a lipase, a hydrolase, and any combination thereof. 1

13. A method according to claim 12, wherein said biocatalyst is chosen from *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, and Pig Liver esterase.

25

14. A method for the resolution of a compound of formula (II),



wherein:

R^{10} is hydrogen, $-(CR^{15}R^{16})_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, $-CH_2CH=CH_2$, $-C(O)R^{18}$, $-C(O)OR^{18}$, $-C(O)C(O)OR^{18}$, or $-Si(R^{15})_2$, wherein said C_6-C_{14} aryl is optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{18}$, and $-N(R^{15}R^{16})$;

5 R^{11} is hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, or $-(CR^{15}R^{16})_x(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{18}$, and $-N(R^{15}R^{16})$;

10 R^{12} and R^{13} are independently chosen from hydrogen, C_1-C_{10} alkyl, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{15}R^{16})_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{15}R^{16})_x(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{18}$, and $-N(R^{15}R^{16})$, provided that R^{12} and R^{13} cannot both be hydrogen;

R^{14} is hydrogen;

15 R^{15} and R^{16} are independently chosen from hydrogen, halo, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkoxy, C_2-C_{10} alkenyl, C_2-C_{10} alkynyl, $-(CR^{17}R^{17})_x(C_6-C_{14} \text{ aryl})$, and $-(CR^{17}R^{17})_x(4-10 \text{ membered heterocyclic})$, wherein said C_6-C_{14} aryl and 4-10 membered heterocyclic are optionally substituted with at least one substituent chosen from halo, C_1-C_{10} alkyl, $-OR^{17}$, and $-N(R^{17}R^{17})$;

20 each R^{17} is independently chosen from hydrogen and C_1-C_{10} alkyl; and
t is an integer from 0 to 5;

said method comprising:

- (i) treating a compound of formula (II), wherein R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , and R^{14} are as defined above, with a chiral, non-racemic base to afford a mixture of diastereomeric salts;
- 25 (ii) separating said diastereomeric salts from each other; and
- (iii) converting said diastereomeric salt to a stereoisomerically enriched compound of formula (II).

15. A method according to claim 14, wherein said chiral, non-racemic base is (R)-(-)-2-phenylglycinol or (S)-(+)-2-phenylglycinol.

30

**PR CEDIMIENTOS PARA PREPARAR AMINAS ENRIQUECIDAS
ESTEREOISOMÉRICAMENTE**

Antecedentes de la Invención

5

La solicitud reivindica prioridad para la Solicitud de patente de los Estados Unidos nº 60/527.143 presentada el 4 de diciembre de 2003, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

10 La presente invención se refiere a procedimientos para la preparación de aminos enriquecidas estereoisoméricamente. Las aminos enriquecidas estereoisoméricamente descritas en la presente memoria descriptiva son útiles en la preparación de compuestos que inhiben la enzima proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

15 El Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causa un colapso gradual del sistema inmune corporal así como un deterioro progresivo de los sistemas nerviosos central y periférico. Desde su reconocimiento inicial a principio de los años 80, el SIDA se ha propagado rápidamente y actualmente ha alcanzado proporciones epidémicas dentro de un segmento relativamente limitado de la población. Se ha llevado a
20 cabo una intensa investigación para descubrir el agente responsable, el retrovirus T-linfotrópico humano tipo III (HLTV-III). Actualmente más comúnmente conocido como VIH.

25 El VIH es un miembro de la clase de los virus conocidos como retrovirus y es el agente etiológico del SIDA. El genoma retroviral se compone de ARN, que se convierte en ADN mediante transcripción inversa. Este ADN retroviral se integra entonces establemente en un cromosoma de la célula huésped, empleando los procesos replicativos de las células huéspedes, produce nuevas partículas retrovirales y hace progresar la infección en otras células. El VIH parece tener una afinidad

particular con la célula linfocito T-4 humano, que desempeña una función importante en el sistema inmunitario humano. La infección por VIH de los leucocitos reduce la población de leucocitos. Eventualmente, el sistema inmunitario se vuelve inoperante e ineficaz contra diversas enfermedades oportunistas tales como, entre otras, la neumonía por *Pneumocystis carini*, el sarcoma de Kaposi, y el cáncer del sistema linfático.

Aunque no se comprende el mecanismo exacto de la formación y del funcionamiento del virus VIH, en la identificación del virus se han hecho algunos progresos para controlar la enfermedad. Por ejemplo, se ha descubierto que el fármaco azidotimidina (AZT) es eficaz para inhibir la transcripción inversa del genoma retroviral del virus VIH, proporcionando de este modo una medida de control, aunque no una cura, para los pacientes aquejados de Sida. Se prosigue la búsqueda de fármacos que puedan curar o al menos, proporcionar una mejor medida de control del virus mortal VIH y de este modo del tratamiento del SIDA y de las enfermedades asociadas.

La replicación retroviral se caracteriza de manera rutinaria por el proceso de postraducción de las poliproteínas. Este proceso se lleva a cabo mediante la enzima proteasa del VIH viralmente codificada. Esto produce polipéptidos maduros que posteriormente ayudan a la formación y a la función del virus infeccioso. Si se detiene este proceso molecular, entonces se termina la producción normal del VIH. Por lo tanto, los inhibidores de la proteasas del VIH pueden funcionar como agentes virales antil-VIH.

La proteasa del VIH es uno de los productos traducidos del gen pol25 de la proteína estructural del VIH. Esta proteasa retroviral escinde específicamente otros polipéptidos estructurales en lugares discretos para liberar estas enzimas y proteínas estructurales recién activadas, con lo que se hace que el virión sea de replicación competente. De este modo, la

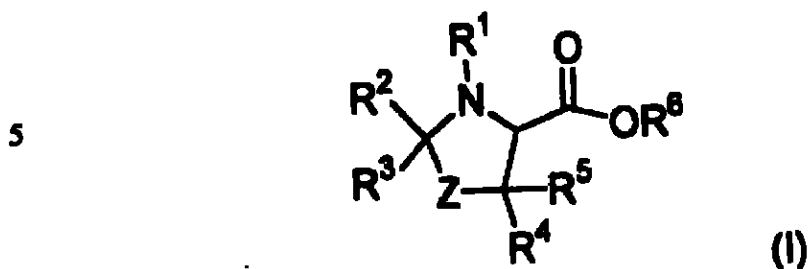
26
26

Inhibición de la proteasa del VIH por potentes compuestos puede prevenir la integración proviral de los linfocitos T infectados durante la fase inicial del ciclo de vida del VIH-1, así como inhibir el proceso proteolítico viral durante su fase terminal. Además, los inhibidores de la proteasa pueden
5 tener las ventajas de ser más fácilmente disponibles, de sobrevivir más tiempo en el virus, y ser menos tóxicos que los fármacos actualmente disponibles, posiblemente debido a su especificidad para la proteasa retroviral.

Se han descrito procedimientos para preparar compuestos útiles
10 como inhibidores de la proteasa del VIH en, por ejemplo la patente de los Estados Unidos nº 5.962.640; la patente de los Estados Unidos nº 5.932.550; la patente de los Estados Unidos nº 6.222.043; la patente de los Estados Unidos nº 5.644.028; el documento WO 02/100844, la patente australiana nº 705193; la solicitud de patente canadiense nº 2.179.935; la
15 solicitud de patente europea nº 0 751 145; la solicitud de patente japonesa nº 100.867.489; Y. Hayahsi, *et al.*, J. Org. Chem., 66 5537-5544 (2001); K. Yoshimura, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8675-8680 (1999); y T. Mimoto, *et al.*, J. Med. Chem., 42, 1789-1802 (1999). Muchos inhibidores de la proteasa del VIH son moléculas complejas que contienen uno o más
20 átomos de carbono asimétricos. La preparación de tales compuestos de una manera eficaz y selectiva estereoquímicamente es un reto al que se enfrentan los químicos sintéticos. Aunque se han desarrollado algunos procedimientos sintéticos estereoselectivos para abordar estas necesidades, generalmente no se pueden aplicar a una amplia gama de
25 moléculas. De este modo, sigue existiendo la necesidad de desarrollar procedimientos estereoselectivos que se puedan usar para preparar eficazmente tales moléculas complejas.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I)



en la que

10 Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;

R¹ es hidrógeno, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, -C(O)C(O)OR⁷ o -Si(R⁷)₃, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

15 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

20 N(R⁷R⁸);

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

25

R⁶ es hidrógeno;

R⁷ y R⁸ se selecciona cada uno independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -

28
20

$(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

5 cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5;

comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (I), en la que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son tal como se han definido anteriormente y R^6 se selecciona de alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^7R^8)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^7R^8)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

Otro aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I), en la que

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o $-(CR^7R^8)_t$;

R^1 es $-(CR^7R^8)_t$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$ o $-Si(R^7)_3$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ;

29

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo y alquilo C_1-C_{10} ;

R^6 es hidrógeno;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquénilo C_2-C_{10} , alquínilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

10 cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5;

En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I), en la que

Z es O, S, $C=O$, $C=CH_2$, o $-(CR^7R^8)-$;

R^1 es $-(CH_2)_t$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$ o $-C(O)C(O)OR^7$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ;

25 R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo y alquilo C_1-C_{10} ;

R^6 es hidrógeno;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquénilo C_2-C_{10} , alquínilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

$(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

5 cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 1 a 3;

En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I), en la que

Z es O, S, $C=O$, $C=CH_2$, o $-(CR^7R^8)-$;

15 R^1 es $-(CH_2)$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$ o $-C(O)C(O)OR^7$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 y $-N(R^7R^8)$;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, butilo y pentilo;

20 R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, metilo etilo, butilo y pentilo;

R^6 es hidrógeno;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , y arilo C_6-C_{14} , en la que
25 dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$; y

cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} .

~~8~~
81

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I), en la que

- 5 Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;
 R¹ es -CH₂Ph, -C(O)OR⁷ o -C(O)C(O)OR⁷;
 R² y R³ son hidrógeno;
 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;
 R⁶ es hidrógeno;
10 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀.

- La presente invención proporciona también cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la
15 preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I) , en la que

- Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;
 R¹ es -CH₂Ph, -C(O)OCH₃; -C(O)OC(CH₃)₃ o -C(O)C(O)OCH₃;
 R² y R³ son hidrógeno;
20 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;
 R⁶ es hidrógeno; y
 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, flúor, metilo y -OCH₃.

- 25 En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I) , en la que

 Z es S;

42
02

R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 son metilo; y

R^6 es hidrógeno.

5

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I), en la que

10 Z es $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{CH}_2$, o $-(\text{CR}^7\text{R}^8)-$;

R^1 es $-(\text{CR}^7\text{R}^8)_t$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$), $-\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$ - $\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$ o $-\text{Si}(\text{R}^7)_3$, en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, OR^7 y $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^8)$;

15 R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$;

R^6 es hidrógeno;

20 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenoilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquinoilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^9\text{R}^9)_t$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) y $-(\text{CR}^9\text{R}^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de

25 halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, $-\text{OR}^9$, y $-\text{N}(\text{R}^9\text{R}^9)$;

cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$; y

t es un número entero de 0 a 5.

3
23

Otro aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I), en la que

- 5 Z es $C=O$, $C=CH_2$, o $-(CR^7R^8)-$;
 R^1 es $-CH_2Ph$, $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$ o $-C(O)C(O)OR^7$;
 R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ;
 R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo y
10 alquilo C_1-C_{10} ;
 R^6 es hidrógeno
 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxil C_1-C_{10} , alquénilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_1$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_1$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la
15 que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;
 cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y
20 t es un número entero de 1 a 3.

- En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I) , en la que

25 Z es $-(CR^7R^8)-$;
 R^1 es $-CH_2Ph$, $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$ o $-C(O)C(O)OCH_3$;
 R^2 y R^3 son hidrógeno;

8/11
02

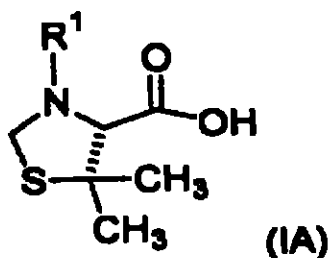
R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo, etilo, butilo y pentilo;

R^6 es hidrógeno; y

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, flúor, cloro, alquilo C_1-C_{10} y alcoxy C_1-C_{10} ;

La presente invención se refiere además a procedimientos para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IA)

10



15

en la que

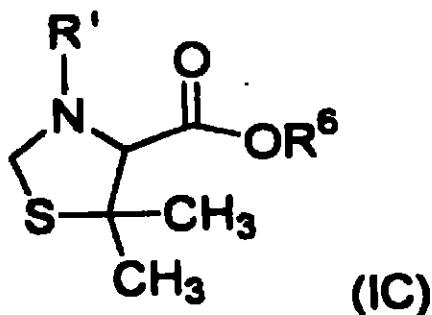
R^1 es $-CH_2Ph$, $-C(O)OR^7$, o $-C(O)C(O)OR^7$; y

R^7 es alquilo C_1-C_{10} ;

comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (IC),

20



25

en la que R^1 , es tal como se ha definido anteriormente y R^6 se selecciona de alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-CH_2$ (arilo C_6-C_{14}) y $-CH_2$ (heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C_6

C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -N(R⁷R⁷), con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se
5 hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

La presente invención se refiere además a cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IA), en la
10 que R¹ es -C(O)OC(CH₃)₃, que comprende tratar un compuesto de fórmula (IC), en la que R¹ es -C(O)OC(CH₃)₃, y R⁶ es -CH₃, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

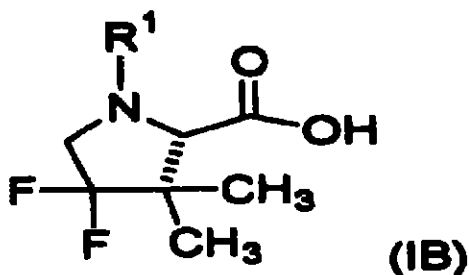
15

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IA), en la que R¹ es -CH₂Ph, que comprende tratar un compuesto de
20 fórmula (IC), en la que R¹ es -CH₂Ph y R⁶ es -CH₃ con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

25 En otro aspecto de la presente invención se proporcionan procedimientos para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IB),

80
86

5

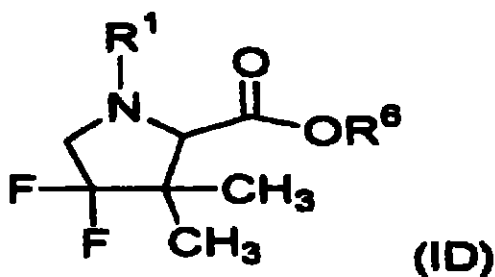


en la que R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^7$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{O R}^7$; y
 R^7 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$

10

comprendiendo dicho procedimiento:
 tratar un compuesto de fórmula (ID),

15



20

en la que R^1 , es tal como se ha definido anteriormente y R^6 se
 selecciona de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquínilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-\text{CH}_2(\text{arilo}$
 $\text{C}_6\text{-C}_{14})$ y $-\text{CH}_2(\text{heterociclo de 4-10 miembros})$, y en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-}$
 C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos
 con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, OR^7 , y
 25 $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^7)$, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente
 orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se
 hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

La presente invención se refiere además a cualquiera de los

87
87

procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IB), en la que R^1 es $-C(O)OC(CH_3)_3$, que comprende tratar un compuesto de fórmula (ID), en la que R^1 es $-C(O)OC(CH_3)_3$, y R^6 es $-CH_3$, con un
5 biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

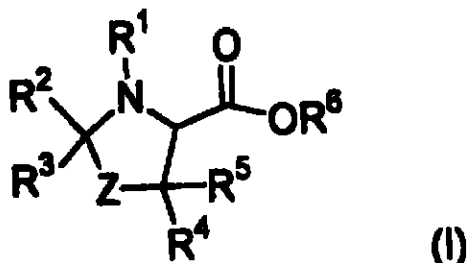
En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona
10 cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IB), en la que R^1 es $-CH_2Ph$, comprendiendo tratar un compuesto de fórmula (ID), en la que R^1 es $-CH_2Ph$, y R^6 es $-CH_3$, con un biocatalizador en una solución acuosa,
15 un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

Igualmente se proporciona en la presente invención cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para
20 preparar compuestos enriquecidos estereoisoméricamente de las fórmulas (I), (IA) e (IB), en las que dicho biocatalizador se selecciona de una proteasa alcalina, una esterasa, una lipasa, una hidrolasa, y una combinación cualquiera de las mismas. En otro aspecto de la presente invención se proporcionan procedimientos en los que dicho biocatalizador
25 se selecciona de *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* y esterasa de hígado de cerdo.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la resolución de un compuesto de fórmula (I)

88
88

5



en la que

- 10 Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;
- R¹ es hidrógeno, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, -C(O)C(O)OR⁷ o -Si(R⁷)₃, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -N(R⁷R⁸);
- 15 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C₆-C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -
- 20 N(R⁷R⁸);
- R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al
- 25 menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁷, y -N(R⁷R⁸);
- R⁶ se selecciona de alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C₆-C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están

09
84

opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, alquililo C₂-C₁₀, -(CR⁹R⁹)_t(arilo C₆-C₁₄) y -
5 (CR⁹R⁹)_t(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁹, y -N(R⁹R⁹);

cada R⁹ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo
10 C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 0 a 5;

comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (I) con un biocatalizador en un disolvente acuoso, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes
15 orgánico y acuoso para obtener un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I) en la que R⁹ es hidrógeno.

Otro aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la
20 resolución de un compuesto de fórmula (I) en la que

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)_t;

R¹ es -(CR⁷R⁸)_t(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, -C(O)C(O)OR⁷ o -Si(R⁷)₃, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente
25 sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀;

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀;

90
90

R^6 es hidrógeno;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la resolución de un compuesto de fórmula (I) en la que

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o $-(CR^7R^8)-$;

R^1 es $-(CH_2)_t$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$ o $-C(O)C(O)OR^7$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} ;

R^6 es hidrógeno;

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de

a1
X

halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁹, y -N(R⁹R⁹);

cada R⁹ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 1 a 3.

5

En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la resolución de un compuesto de fórmula (I), en la que

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;

10 R¹ es -(CH₂)(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)OR⁷ o -C(O)C(O)OR⁷, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷ y -N(R⁷R⁸);

15 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, butilo y pentilo;

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, metilo etilo, butilo y pentilo;

R⁶ es hidrógeno;

20 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, alquienilo C₂-C₁₀, y arilo C₆-C₁₄, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁹, y -N(R⁹R⁹); y

cada R⁹ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀.

25

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la resolución de un compuesto de fórmula (I), en la que

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;

42
92

R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^6 es hidrógeno;

- 5 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, y alcoxy $\text{C}_1\text{-C}_{10}$.

- La presente invención también proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la
10 resolución de un compuesto de fórmula (I) , en la que

Z es O, S, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{CH}_2$, o $-(\text{CR}^7\text{R}^8)-$;

R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

- 15 R^6 es hidrógeno; y

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, flúor, metilo y $-\text{OCH}_3$.

- En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera
20 de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la resolución de un compuesto de fórmula (I) , en la que

Z es S;

R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

- 25 R^4 y R^5 son metilo; y

R^6 es hidrógeno.

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria

93
23

descriptiva para la resolución de un compuesto de fórmula (I) , en la que

Z es C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;

R¹ es -(CR⁷R⁸)_t(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷ -
C(O)C(O)OR⁷ o -Si(R⁷)₃, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente
5 sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-
C₁₀, OR⁷ y -N(R⁷R⁸);

R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo
C₁-C₁₀;

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo y
10 alquilo C₁-C₁₀;

R⁶ es hidrógeno;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo,
alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, -
(CR⁹R⁹)_t(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁹R⁹)_t(heterociclo de 4-10 miembros), en la
15 que dicho arilo C₆-C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están
opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de
halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁹, y -N(R⁹R⁹);

cada R⁹ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo
C₁-C₁₀; y

20 t es un número entero de 0 a 5.

Otro aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los
procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la
resolución de un compuesto de fórmula (I) , en la que

25 Z es C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;

R¹ es -CH₂Ph, -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷ o -C(O)C(O)OR⁷ ;

R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo
C₁-C₁₀;

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo y

94
H

alquilo C₁-C₁₀;

R⁶ es hidrógeno

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, -
5 (CR⁸R⁸)_x(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁸R⁸)_x(heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C₆-C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁶, y -N(R⁸R⁸);

cada R⁸ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo

10 C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 1 a 3.

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria
15 descriptiva para la resolución de un compuesto de fórmula (I), en la que

Z es -(CR⁷R⁸)_x;

R¹ es -CH₂Ph, -CH₂-CH=CH₂, -C(O)OCH₃, -C(O)OC(CH₃)₃ o -
C(O)C(O)OCH₃;

R² y R³ son hidrógeno;

20 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo, etilo, butilo y pentilo;

R⁶ es hidrógeno; y

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, flúor, cloro, alquilo C₁-C₁₀ y alcoxi C₁-C₁₀.

25

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II),

ab
AB

C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 0 a 5;

comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (II), en la que R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ son
5 tales como se han definido anteriormente y R¹⁴ se selecciona de alquilo C₁-
C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR¹⁵R¹⁶)_t(arilo C₆-C₁₄) y -
(CR¹⁵R¹⁶)_x(heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C₆-C₁₄ y
dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con
al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR¹⁵, y -
10 N(R¹⁵R¹⁶), con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente
orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se
hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona
cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria
15 descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido
estereoisoméricamente de fórmula (II), en la que

R¹⁰ es -(CR¹⁵R¹⁶)_t(arilo C₆-C₁₄), -C(O)OR¹⁵ o -C(O)C(O)OR¹⁵ en la
que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un
20 sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR¹⁵, y -N(R¹⁵R¹⁶);

R¹¹ es hidrógeno alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -
(CR¹⁵R¹⁶)_x(arilo C₆-C₁₄) o -(CR¹⁵R¹⁶)_x(heterociclo de 4-10 miembros), en la
que dicho arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están
opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de
25 halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁵, y -N(R¹⁵R¹⁶);

R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de hidrógeno alquilo
C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR¹⁵R¹⁶)_t(arilo C₆-C₁₄) y -
(CR¹⁵R¹⁶)_x(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el
heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al

ax
Q

menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁵, y -N(R¹⁶R¹⁶), siempre que R¹² y R¹³ no puedan ser ambos hidrógeno;

R¹⁴ es hidrógeno;

R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente de, hidrógeno, halo
5 alquilo C₁-C₁₀, alcoxil C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -
(CR¹⁷R¹⁷)_t(arilo C₆-C₁₄) y -(CR¹⁷R¹⁷)_t(heterociclo de 4-10 miembros), en la
que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están
opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de
halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁷, y -N(R¹⁷R¹⁷);

10 cada R¹⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo
C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 0 a 5.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona cualquiera
15 de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la
preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de
fórmula (II), en la que

R¹⁰ es -C(O)OR¹⁶ o -C(O)C(O)OR¹⁶;

R¹¹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀;

20 R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo
C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, siempre que R¹² y R¹³ no
puedan ser ambos hidrógeno;

R¹⁴ es hidrógeno; y

R¹⁵ es alquilo C₁-C₁₀.

25

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona
cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria
descriptiva para la preparación de un compuesto enriquecido
estereoisoméricamente de fórmula (II), en la que

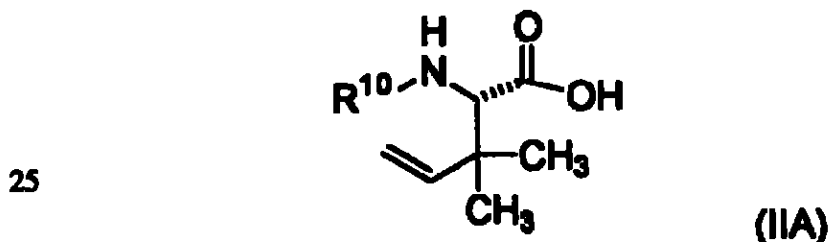
28
58

- R^{10} es $-C(O)OR^{15}$ o $-C(O)C(O)OR^{15}$
 R^{11} es hidrógeno;
 R^{12} es hidrógeno;
 R^{13} es alqueno C_2-C_{10} ;
5 R^{14} es hidrógeno; y
 R^{15} es alquilo C_1-C_{10} .

Otro aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para la
10 preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II), en la que

- R^{10} es $-C(O)OR^{15}$ o $-C(O)C(O)OR^{15}$
 R^{11} es hidrógeno;
 R^{12} es hidrógeno;
15 R^{13} es alqueno C_2-C_5 ;
 R^{14} es hidrógeno; y
 R^{15} es $-C(CH_3)_3$.

La presente invención se refiere también a procedimientos para la
20 preparación de un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IIA)



en la que

R^{10} se selecciona de hidrógeno, $-(CR^{15}R^{16})_x$ (anillo C_6-C_{14}), $-CH_2-$

ag

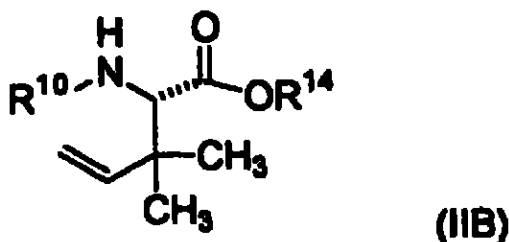
$\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{15}$ y $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^{15}$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{17}\text{R}^{17})_t$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) y $-(\text{CR}^{17}\text{R}^{17})_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, OR^{17} , y $-\text{N}(\text{R}^{17}\text{R}^{17})$;

cada R^{17} se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$; y

t es un número entero de 0 a 5;
comprendiendo dicho procedimiento:
tratar un compuesto de fórmula (IIB)

15



en la que R^{10} es tal como se define anteriormente y R^{14} es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

Igualmente se proporciona en la presente invención cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IIA), en la que R^{10} es $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, comprendiendo dicho procedimiento, tratar un compuesto de fórmula (IIB), en la que R^{10} es tal

100
100

como se ha definido anteriormente y R^{14} es metilo, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

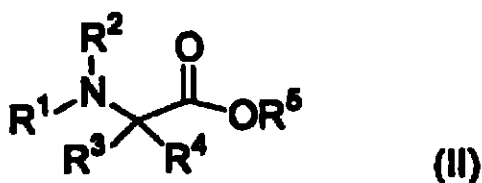
5

Igualmente se proporciona en la presente invención cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para preparar compuestos enriquecidos estereoisoméricamente de las fórmulas (II), y/o (IIA), en las que dicho biocatalizador se selecciona de una proteasa
10 alcalina, una esterasa, una lipasa, una hidrolasa, y una combinación cualquiera de las mismas. En otro aspecto de la presente invención se proporcionan procedimientos en los que dicho biocatalizador se selecciona de *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus subtilis*, y esterasa de hígado de cerdo.

15

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan procedimientos para la resolución de un compuesto de fórmula (II)

20



en la que

25

R^1 es hidrógeno, $-(CR^7R^8)_1$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)R^7$, $-C(O)OR^7$, $-C(O)C(O)OR^7$ o $-Si(R^7)_3$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$;

R^2 es hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , -

101
101

$(CR^7R^8)_t$ (arilo C_6-C_{14}) o $-(CR^7R^8)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$;

- 5 R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^7R^8)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^7R^8)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^7$, y $-N(R^7R^8)$, siempre que R^3 y R^4 sean ambos hidrógeno;

- 10 R^5 se selecciona de alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^7R^8)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^7R^8)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^7$, y $-N(R^7R^8)$;

- 15 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5;

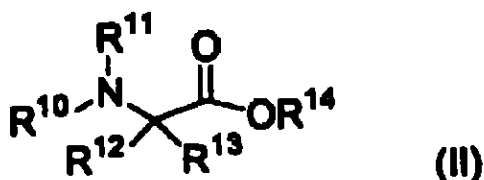
- 25 comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (II) con un biocatalizador en un disolvente acuoso, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso para obtener un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II) en la que R^5 es hidrógeno.

102
102

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporcionan procedimientos para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II),

5



10 en la que

R^{10} es hidrógeno, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_1$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$), $-\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$, $-\text{C(O)R}^{15}$, $-\text{C(O)OR}^{15}$, $-\text{C(O)C(O)OR}^{15}$ o $-\text{Si(R}^{15})_3$, en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, OR^{15} , y $-\text{N(R}^{15}\text{R}^{16})$;

15 R^{11} es hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_1$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) o $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_1$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, $-\text{OR}^{15}$, y $-\text{N(R}^{15}\text{R}^{16})$;

20 R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de, hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_1$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) y $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_1$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, $-\text{OR}^{15}$, y $-\text{N(R}^{15}\text{R}^{16})$, siempre que R^{12} y R^{13} no puedan ser ambos hidrógeno;

25 R^{14} es hidrógeno;

R^{14} es hidrógeno;

R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente de, hidrógeno, halo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{17}\text{R}^{17})_1$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) y $-(\text{CR}^{17}\text{R}^{17})_1$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la

103
103

que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^{17}$, y $-N(R^{17}R^{17})$;

cada R^{17} se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo

5 C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5;

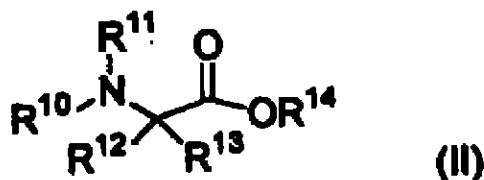
comprendiendo dicho procedimiento:

- (i) tratar un compuesto de fórmula (II), en la que R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son tal como se han definido anteriormente, con una base quiral no racémica para obtener una mezcla de sales diastereoméricas;
- (ii) separar dichas sales diastereoméricas entre sí, y
- (iii) convertir dicha sal diastereomérica en un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II).

15

En otro aspecto adicional de la presente invención se proporcionan procedimientos para la resolución de un compuesto de fórmula (II),

20



en la que

25 R^{10} es hidrógeno, $-(CR^{15}R^{16})_1$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)R^{16}$, $-C(O)OR^{16}$, $-C(O)C(O)OR^{16}$ o $-Si(R^{15})_3$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^{16} , y $-N(R^{15}R^{16})$;

R^{11} es hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} ,

104
104

$-(CR^{15}R^{16})_t$ (arilo C_6-C_{14}) o $-(CR^{15}R^{16})_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^{15}$, y $-N(R^{15}R^{16})$;

- 5 R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de, hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , $-(CR^{15}R^{16})_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^{15}R^{16})_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^{15}$, y $-N(R^{15}R^{16})$, siempre que R^{12} y R^{13} no puedan ser ambos hidrógeno;

R^{14} es hidrógeno;

- R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente de, hidrógeno, halo alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , $-(CR^{17}R^{17})_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^{17}R^{17})_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la
- 15 que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^{17}$, y $-N(R^{17}R^{17})$;

cada R^{17} se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

- 20 t es un número entero de 0 a 5;

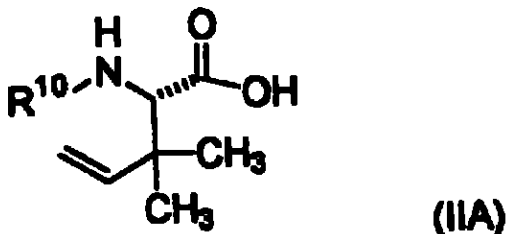
comprendiendo dicho procedimiento:

- (i) tratar un compuesto de fórmula (II), en la que R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son tal como se han definido anteriormente, con una base quiral no racémica para obtener una mezcla de
- 25 sales diastereoméricas;
- (ii) separar dichas sales diastereoméricas entre sí, y
- (iii) convertir dicha sal diastereomérica en un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II).

105
X

La presente invención también se refiere a procedimientos para resolver un compuesto de fórmula (IIA),

5



10 en la que

R^{10} se selecciona de hidrógeno, $-(CR^{15}R^{16})_t$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)C(O)OR^{15}$; y

Cada uno de R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente de, hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} ,
 15 $-(CR^{17}R^{17})_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^{17}R^{17})_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^{17}$, y $-N(R^{17}R^{17})$;

cada R^{17} se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo
 20 C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5;

comprendiendo dicho procedimiento:

- (i) tratar un compuesto de fórmula (IIA); en la que R^{10} es tal como se ha definido anteriormente, con una base quiral no racémica para obtener una mezcla de sales diastereoméricas;
- 25 (ii) separar dichas sales diastereoméricas entre sí, y
- (iii) convertir dicha sal diastereomérica en un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IIA).

También se proporciona en la presente invención cualquiera de los

106
X/06

procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para resolver un compuesto de fórmula (IIA) en la que R^{10} es $-C(O)OC(CH_3)_3$.

También se incluye en la presente invención cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para resolver
5 un compuesto de fórmula (IIA) en la dicha base quiral no racémica es o bien (R)-(-)-2-fenilglicinol o (S)-(+)-2-fenilglicinol. Otros agentes de resolución útiles en la presente invención incluyen otras aminas quirales no racémicas que incluyen, pero no se limita a ello, bien enantiómero de 2-amino-1-fenil-1,3-propanodiol y, bien enantiómero de 1-fenil-1-aminoetano.

10 Tal como se usan en la presente memoria descriptiva, los términos "comprender" e "incluir" se usan en su sentido amplio no limitativo.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "VIH significa Virus de Inmunodeficiencia humana. El término "proteasa del VIH", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, significa la
15 enzima de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana.

El término "alquilo C_1-C_{10} ", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, incluye radicales de hidrocarburo monovalente saturado que tienen restos lineales, ramificados o cíclicos (que incluyen restos bicíclicos condensados y con puente y
20 espirocíclicos) o una combinación de los restos anteriores, y que contienen entre 1 y 10 átomos de carbono. Para que un grupo alquilo tenga restos cíclicos, el grupo debe tener al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, iso-butilo, *tert*-butilo, etc.

25 El término "alquenilo C_2-C_{10} ", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, incluye restos alquilo que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono en el que el alquilo es tal como se ha definido anteriormente y que incluyen isómeros E y Z de dicho resto alquenilo, y que tienen entre 2 y 10 átomos de carbono.

107
102

El término "alquínilo C_2-C_{10} ", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, incluye restos alquilo que tienen al menos un enlace triple carbono-carbono en el que el alquilo es tal como se ha definido anteriormente y que contienen entre 2 y

5 10 átomos de carbono.

Se entiende que un "grupo cicloalquilo C_3-C_{10} " significa una estructura de anillo, monocíclico, o policíclico condensado o espiropolicíclico saturado o parcialmente saturado, que tiene un total de 3 a 10 átomos de carbono del anillo (pero no heteroátomos). Los

10 cicloalquilos ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, y grupos similares.

El término "arilo C_6-C_{10} " tal como se usa en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, incluye un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático por retirada de un hidrógeno, tal

15 como un fenilo o naftilo. Los términos "Ph" y "fenilo", tal como se usan en la presente memoria, significan un grupo $-C_6H_5-$

El término "heterocíclico de 4-10 miembros" tal como se usa en la presente memoria, a menos que se indique otra cosa, incluye grupos heterocíclicos aromáticos y no aromáticos que contienen de uno a cuatro heteroátomos,

20 cada uno seleccionado de O, S y N, en los que cada que grupo heterocíclico tiene entre 4 y 10 átomos en su sistema de anillo, y siempre que el anillo de dicho grupo no contenga dos átomos de O o S adyacentes. Además, los átomos de azufre contenidos en tales grupos heterocíclicos se puede oxidar con uno o dos átomos de azufre. Los grupos heterocíclicos

25 no aromáticos incluyen grupos que tienen sólo 4 átomos en su sistema de anillo, pero los grupos heterocíclicos aromáticos deben tener al menos 5 átomos en su sistema de anillo. Los grupos heterocíclicos incluyen sistemas de anillo benzocondensados. Un ejemplo de un grupo heterocíclico de 4 miembros es el azetidínilo (derivado de la azetidina). Un

108
708

ejemplo de un grupo heterocíclico de 5 miembros es el tiazolilo y un ejemplo de un grupo heterocíclico de 10 miembros es el quinolinilo. Ejemplos de grupos heterocíclicos no aromáticos son el pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, dihydrofuranilo, tetrahydrothienilo, tetrahydropiranilo, 5 dihidropiranilo, tetrahydrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, azetidino, oxetanilo, tetanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditiánilo, ditiolanilo, 10 dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihydrofuranilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, 3H-indolilo y quinolizinilo. Ejemplo de grupos heterocíclicos aromáticos son el piridinilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, 15 isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indozinilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo. Los grupos anteriores, derivados de los grupos anteriormente 20 mencionados, pueden fijarse por C o por N allí donde sea posible. Por ejemplo un grupo derivado de pirrol puede ser pirrol-1-ilo (fijado por N) o pirrol-3-ilo (fijado por C). Además un grupo derivado de imidazol puede ser imidazol-1-ilo (fijado por N) o imidazol-3-ilo (fijado por C). Además, un grupo derivado de imidazol puede ser imidazol-1-ilo (fijado por N) o 25 imidazol-3-ilo (fijado por C). Un ejemplo de un grupo heterocíclico en el que 2 átomos de carbono del anillo están sustituidos con restos oxo (=O) es 1,1-dioxotiomorfolinilo.

Se entiende que un "grupo heteroarilo" significa una estructura de anillo aromático monocíclico o policíclico condensado o espiropolicíclico

109
HCA

que tiene 4 a 18 átomos del anillo, incluyendo entre 1 y 5 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Ejemplos ilustrativos de los grupos heteroarilo incluyen pirrolilo, tienilo, oxazolilo, pirazolilo, tiazolilo, furilo, piridinilo, pirazinilo, triazolilo, tetrazolilo, indolilo, quinolinilo, 5 quinoxalinilo, benzotiazolilo, benzodioxinilo, benzodioxolilo, benzooxazolilo, y similares.

El término "alcoxi" tal como se usa en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, incluye grupos O-alquilo en los que el alquilo es tal como se ha definido anteriormente.

10 Los términos "halógeno" y "halo" tal como se usan en la presente memoria descriptiva representan cloro, flúor, bromo o yodo.

El término "sustituido", significa que el grupo o el resto especificado lleva uno o más sustituyentes. El término "insustituido", significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. El término "opcionalmente 15 sustituido" significa que el grupo especificado está insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes.

De acuerdo con una convención usada en la técnica, el símbolo  se usa en fórmulas estructurales en la presente memoria descriptiva para describir el enlace que es el punto de fijación del resto o sustituyente al núcleo o estructura de base. De acuerdo con otra convención, en 20 algunas fórmulas estructurales en la presente memoria descriptiva los átomos de carbono y sus átomos de hidrógeno unidos no se describen explícitamente,

por ejemplo  representa un grupo metilo,  representa un 25 grupo etilo



, representa un grupo ciclopentilo, etc.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen

110
148

- idéntica constitución química, pero difieren respecto de la disposición de sus átomos o grupos en el espacio. En particular, el término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles uno de otro. Los términos
- 5 "racémico" o mezcla racémica", tal como se usan en la presente memoria descriptiva, se refieren a una mezcla 1:1 de enantiómeros de un compuesto particular. El término "diastereómeros, se refiere, por otra parte, a la relación entre un par de estereoisómeros que comprenden dos o más centros asimétricos y no son imágenes especulares uno de otro.
- 10 El término producto "enriquecido estereoquímicamente", cuando se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un producto de reacción en el que está presente un estereoisómero particular en una mayor cantidad estadísticamente significativa respecto de los otros posibles productos estereoisoméricos. Por ejemplo, un producto que
- 15 comprende más de un enantiómero que del otro constituiría un producto enriquecido estereoquímicamente. Igualmente, un producto que comprende más de un diastereoisómero que de los otros constituiría un producto enriquecido estereoquímicamente. Los procedimientos y los procesos contenidos en la presente memoria descriptiva se dice que
- 20 obtienen un producto enriquecido estereoquímicamente". En tales casos, los procedimientos y procesos contenidos en la presente memoria descriptiva empiezan con una mezcla de compuestos estereoisoméricos en la que todos los posibles estereoisómeros están presentes en aproximadamente una cantidad igual y obtienen un producto en el que al
- 25 menos está presente un estereoisómero en una mayor cantidad estadísticamente significativa que los otros.

Si el material de partida constituye una mezcla de estereoisómeros, tales como una mezcla racémica, un estereoisómero puede reaccionar más lentamente que los otros en presencia de un reactivo o catalizador

111
H

quiral no racémico, tal como un biocatalizador, una base ópticamente activa, o un ácido ópticamente activo. Tal reacción se puede denominar en la presente memoria descriptiva como una resolución cinética, en la que los enantiómeros reactivos se resuelven mediante velocidades de reacción diferentes para obtener tanto el producto enriquecido estereoquímicamente como el material de partida no reaccionado enriquecido estereoquímicamente. La resolución cinética se suele llevar a cabo usando una cantidad suficiente de un reactivo o catalizador quiral no racémico para reaccionar con sólo un estereoisómero del material de partida.

El término "base quiral no racémica", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, significa un compuesto básico que puede existir en forma enantiomérica y no está presente en una cantidad igual con su enantiómero correspondientemente opuesto. Por ejemplo, el compuesto 2-fenilglicinol existe en forma de dos enantiómeros de configuración opuesta, los denominados enantiómeros (R) y (S). Si los enantiómeros (R) y (S) están presentes en iguales cantidades, se dice que tal mezcla es "racémica". Sin embargo, si un enantiómero se encuentra presente en una mayor cantidad que el otro, se dice que la mezcla es "no racémica".

Los términos "resolución" y "resolver" significan un procedimiento de separación física de los compuestos estereoisoméricos de una mezcla de estereoisómeros, tal como una mezcla racémica que comprende dos enantiómeros de un compuesto particular. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "resolución" y "resolver" significa que incluyen tanto una resolución parcial como una resolución completa.

Los términos "proceso enzimático", "procedimiento enzimático", "reacción enzimática", o "resolución enzimática" denotan un proceso, procedimiento o reacción de la presente invención que emplea una enzima o un microorganismo.

112
XLL

El término "biocatalizador", tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una enzima o una mezcla de enzimas que se puede obtener a partir de animales, plantas, microorganismos o similares. La enzima o enzimas se pueden emplear en cualquier forma tal como en una
5 forma purificada, una forma bruta, una mezcla con otras enzimas, un caldo de fermentación microbiana, un caldo de fermentación, un cuerpo microbiano, un filtrado de caldo de fermentación, y similares, bien solo o en combinación. Además, la enzima o el cuerpo microbiano se pueden inmovilizar, tal como sobre una resina, o pueden estar en forma sólida tal
10 como en forma de un cristal de enzima reticulado

Además, un "procedimiento estereoselectivo" es uno que produce un estereoisómero particular de un producto de reacción preferiblemente a otros posibles estereoisómeros del producto. La enantioselectividad se cuantifica generalmente como "exceso enantiomérico" (ee) tal como se
15 define a continuación: [% de exceso enantiomérico A(ee)=(% del enantiómero A) - (% del enantiómero B)], donde A y B son los productos enantioméricos formados a partir de los materiales de partida.

Los compuestos de la presente invención pueden tener átomos de carbono asimétricos. Los enlaces carbono-carbono de los compuestos de
20 la presente invención se pueden describir en la presente memoria descriptiva usando una línea continua (—), una cuña sólida (▲), o una cuña discontinua (---). El uso de una línea continua para describir enlaces con átomos de carbono asimétricos indica que se incluyen todos los posibles estereoisómeros en este carbono. El uso de una cuña llena o
25 de una cuña discontinua para describir enlaces con átomos de carbono asimétricos indica que sólo se ha de incluir el estereoisómero mostrado. Es posible que los compuestos de la invención puedan contener más de un átomo de carbono asimétrico. En estos compuestos, el uso de una línea

113
X

continua para describir enlaces con átomos de carbono asimétricos indica que se incluyen todos los posibles estereoisómeros. El uso de una línea continua para describir enlaces con uno o más átomos de carbono asimétricos en un compuesto de la invención y el uso de una cuña llena o
5 discontinua para describir enlaces con otros átomos de carbono asimétricos en el mismo compuesto indica que está presente una mezcla de diastereoisómeros.

El término "tratar", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, significa que permite al menos que dos reactivos químicos
10 entren en contacto el uno con el otro de manera que pueda tener lugar una reacción o transformación química. Por ejemplo, en los procedimientos de la presente invención, un compuesto de fórmula (II), se puede tratar con una base quiral no racémica para obtener una sal como un producto de una reacción química. En tales reacciones, se dice que el compuesto de
15 fórmula (II) ha de ser tratado con la base. Tales reacciones pueden producirse en la fase sólida, la fase líquida o la fase gaseosa, en solución o una combinación de cualquiera de las anteriores dependiendo de la identidad de los reactivos y de sus propiedades físicas.

El término "separación" o "separado", tal como se usa en la presente
20 memoria descriptiva, significa un procedimiento para aislar físicamente al menos dos compuestos químicos diferentes el uno del otro. Por ejemplo, si se realiza una reacción química y se producen al menos dos productos (A) y (B), el procedimiento para aislar tanto (A) y (B) en forma pura se denomina "separación" de (A) y (B).

25 El término "hidrolizado", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, significa una reacción química, que se puede inducir mediante un biocatalizador según la presente invención, en la que un éster, una amida o ambos se convierten en sus derivados ácido carboxílico correspondientes. Por ejemplo si una reacción convierte un compuesto de

114

fórmula (I), en la que R^6 es distinto de hidrógeno, en un compuesto de fórmula (I), en la que R^6 es hidrógeno, se dice que el compuesto de fórmula A se ha hidrollizado.

El término "concertir", tal y como se usa en la presente memoria, significa

5 permitir que tenga lugar una reacción química con un material o materiales de partida para producir un producto químico diferente. Por ejemplo, si se permite que los reactivos químicos (A) y (B) reaccionen el uno con el otro para producir el producto (C), se puede decir que los materiales de partida (A) y (B) se han "convertido" en el producto (C), o se puede decir que (A)

10 se ha "convertido" en (C), o que (B) se "convirtió" en (C). Además, en los procedimientos de la invención, se dice que las formas de sal de los compuestos de fórmula (I) se han "convertido" en un compuesto de fórmula (I). En tales casos, el término "convertido" significa que la forma no-sal de un compuesto de fórmula (I) se preparó a partir de la forma de sal

15 correspondiente, normalmente por reacción con un ácido, base apropiados o una combinación de un ácido y una base.

Las soluciones de compuestos estereoisoméricos individuales de la presente invención pueden girar el plano de luz polarizada. El uso de un símbolo "(+)" o "(-)" en el nombre de un compuesto de la invención indica

20 que una solución de un estereoisómero particular gira el plano de luz polarizada en la dirección "(+)" o "(-)", según se mide usando las técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Las mezclas diastereoméricas se pueden preparar en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias fisicoquímicas mediante los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por cromatografía o cristalización fraccionada. Los enantiómeros se pueden separar convirtiendo las mezclas

115
XPS

enantioméricas en una mezcla diastereomérica por reacción con un compuesto apropiado ópticamente activo (por ejemplo, alcohol), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo hidrolizando) los diastereómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes.

- 5 Todos estos isómeros, incluyendo las mezclas diastereoméricas y los enantiómeros puros son considerados como parte de la invención.

Como alternativa, los compuestos estereoisoméricos individuales de la presente invención se pueden preparar en forma enantioméricamente enriquecida por síntesis asimétrica. La síntesis asimétrica se puede realizar
10 usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como el uso de materiales de partida asimétricos que están comercialmente disponibles o que se preparan fácilmente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, el uso de auxiliares asimétricos que se pueden eliminar al concluir la síntesis, o la resolución de
15 compuestos intermedios usando procedimientos enzimáticos. La elección de tal procedimiento dependerá de factores que incluyen, pero no se limita a, la disponibilidad de los materiales de partida, la relativa eficacia de un procedimiento y de si tales procedimientos son útiles para los compuestos de la invención que contienen grupos funcionales particulares. Tales
20 elecciones están dentro del conocimiento de un experto en la técnica.

Cuando los compuestos de la presente invención contienen átomos de carbono asimétrico, las sales derivadas, fármacos y solvatos pueden existir en forma de estereoisómeros individuales, racematos y/o mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros. Se entiende que todos estos
25 estereoisómeros individuales, racematos y las mezclas de los mismos entran dentro del alcance de la presente invención.

Como generalmente se entiende por parte de los expertos en la técnica, un compuesto ópticamente puro es aquel que es enantioméricamente puro. Preferiblemente, un compuesto ópticamente

116
116

puro según la presente invención comprende al menos un 90% de un estereoisómero individual (el 80,% de exceso enantiomérico), más preferiblemente al menos el 95% (el 90% de e.e.) , incluso más preferiblemente al menos el 97,5% (el 95% de e.e.), y más preferiblemente
5 al menos el 99% (el 98% de e.e.).

Si un derivado usado en el procedimiento de la invención es una base, se puede preparar una sal deseada mediante cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica, incluyendo el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico; ácido
10 bromhídrico; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico; y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético; ácido maleico; ácido succínico; ácido mandélico; ácido fumárico; ácido malónico; ácido pirúvico; ácido oxálico; ácido glicólico; ácido salicílico; ácido de piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico; ácido alfa-hidroxi, tal como
15 ácido cítrico o ácido tartárico; aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico; ácido aromático tal como ácido benzoico o ácido cinnámico; ácido sulfónico, tal como ácido *p*-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, y similares.

Si un derivado usado en el procedimiento de la invención es un
20 ácido, se puede preparar una sal deseada mediante un procedimiento apropiado conocido en la técnica, incluyendo el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria); un hidróxido de metal alcalino o metal alcalinotérreo; o similares. Los ejemplos ilustrativos de las sales
25 apropiadas incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos tales como la glicina y arginina; amoníaco; aminas primarias, secundarias y terciarias; y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina; así como sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

117
119

En el caso de los derivados, los profármacos, las sales o los solvatos que son sólidos, se entiende por parte de los expertos en la técnica que los derivados, profármacos, sales y solvatos usados en el procedimiento de la invención, pueden existir en diferentes formas de
5 cristales o polimorfos, entendiéndose que todos ellos están dentro del alcance de la presente invención y las fórmulas especificadas. Además, los derivados, sales, profármacos y solvatos usados en el procedimiento de la invención pueden existir en forma de tautómeros, entendiéndose que todos ellos están dentro del amplio alcance de la presente invención.

10 Los compuestos de la presente invención que son de naturaleza básica son capaces de formar una amplia variedad de diferentes sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Aunque tales sales deben ser farmacéuticamente aceptables para su administración a los animales, a menudo es deseable en la práctica aislar inicialmente el compuesto de la
15 presente invención de la mezcla de reacción en forma de una sal farmacéuticamente inaceptable y a continuación volver a convertir esta última en el compuesto de base libre mediante tratamiento con un reactivo alcalino y posteriormente convertir la base libre en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido de los
20 compuestos de base de la invención se preparan fácilmente tratando el compuesto de base con una cantidad sustancialmente equivalente del ácido mineral u orgánico elegido en un medio disolvente acuoso o en un disolvente orgánico apropiado, tal como metanol o etanol. Tras la cuidadosa evaporación del disolvente, se obtiene fácilmente la sal sólida
25 deseada. La sal de ácido deseada también se puede precipitar a partir de una solución de la base libre en un disolvente orgánico añadiendo a la solución un ácido mineral u orgánico apropiado.

Los compuestos de la presente invención que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales de bases con diversos cationes

110 115

farmacológicamente aceptables. Los ejemplos de tales sales incluyen las sales de metal alcalino o las sales de metal alcalinotérreo y particularmente, las sales de sodio y potasio. Estas sales se preparan todas por técnicas convencionales. Estas bases químicas que se usan como reactivos para preparar las sales de bases farmacéuticamente aceptables de la invención son las que forman sales de bases no tóxicas con los compuestos ácidos de la presente invención. Tales sales de bases no tóxicas incluyen las derivadas de tales cationes farmacológicamente aceptables como sodio, potasio, calcio y magnesio, etc. Las sales se pueden preparar fácilmente tratando los correspondientes compuestos ácidos con una solución acuosa que contiene los cationes farmacológicamente aceptables deseados, y a continuación evaporando la solución resultante a sequedad, preferiblemente a presión reducida. Como alternativa, también se pueden preparar mezclando soluciones alcohólicas inferiores de los compuestos ácidos y el alcóxido de metal alcalino deseado juntos, y a continuación evaporar la solución resultante a sequedad de la misma manera que antes. En cuyo caso, las cantidades estequiométricas de los reactivos se emplean preferiblemente para garantizar la finalización de la reacción y los máximos rendimientos del producto final deseado.

Las actividades de las enzimas usadas en la invención se expresan en "unidades". Las unidades se definen como la velocidad de hidrólisis de propionato de *p*-nitrofenilo por minuto expresada en $\mu\text{mol/min}$ a temperatura ambiente.

Los ejemplos específicos de las enzimas que se pueden usar según la presente invención son las obtenidas a partir de animales y plantas tales como esterasa de hígado de vaca, esterasa de hígado de cerdo, esterasa de páncreas de cerdo, esterasa de hígado de caballo, esterasa de hígado de perro, fosfatasa de cerdo, amilasa obtenible a partir de la cebada y de la

119
~~119~~

patata y lipasa obtenible a partir del trigo. Otros ejemplos son las hidrolasas obtenidas a partir de microorganismos como *Rhodotorula*, *Trichoderma*, *Candida*, *Hansenula*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizopus*, *Mucor*,
5 *Aspergillus*, *Alkaligenes*, *Pediococcus*, *Klebsiella*, *Geotrichum*, *Lactobacillus*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Actinomucor*, *Enterobacter*, *Torulopsis*, *Corynebacterium*, *Endomyces*, *Saccaromyces*, *Arthrobacter*, *Metshnikowia*, *Pleurotus*, *Streptomyces*, *Proteus*, *Gliocladium*, *Acetobacter*, *Helminthosporium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*,
10 *Citrobacter*, *Absidia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Penicillium* y *Schizophyllum* así como a partir de líquenes y algas.

Los ejemplos específicos de los microorganismos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limita a, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*,
15 *Candida utilis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus chinensis*, *Mucor pusillus*, *Aspergillus Níger*, *Alkaligenes faecalis*, *Torulopsis emobii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pulmilus*, *Bacillus subtilis* var. *Níger*, *Citrobacter freundli*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Pediococcus*
20 *acilactici*, *Klebsiella pneumoniae*, *Absidia hyalospora*, *Geotrichum candidum*, *Schizophyllum commune*, *Nocardia uniformis subtusyanarensis*, *Nocardia uniformis*, *Chromobacterium chocolateum*, *Hansenula anomala* var. *Ciferrii*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Achromobacter lyticus*, *Achromobacter parvulus*, *Achromobacter simplex*, *Torulopsis candida*,
25 *Corynebacterium sepeidonicum*, *Endomyces geotrichum*, *Saccaromyces carvisial*, *Arthrobacter globiformis*, *Streptomyces griseus*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Corynebacterium ezui*, *Lactobacillus casei*, *Cryptococcus albidus*, *Pichia polymorpha*, *Penicillium frequentans*, *Aureobasidium pullulans*, *Actinomucor elegans*, *Streptomyces griseus*,

120
420

Proteus vulgaris, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Acetobacter aurantius*, *Helminthosporium* so. *Chromobacterium iodinum*, *Chromobacterium violaceum*, *Flavobacterium lutescens*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pleurotus ostreatus*, *Brevibacterium ammoniagenes*,
5 *Brevibacterium divaricatum*, *Escherichia coli*, *Rhodotulura minuta* var. *Texensis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Mucor javanicus*, *Flavobacterium arborescens*, *Flavobacterium heparinum* y *Flavobacterium capsulatum*.

Las enzimas ejemplares comercialmente disponibles apropiadas para su uso en la presente invención incluyen lipasas tales como Amano
10 PS-30 (*Pseudomonas cepacia*), Amano GC-20 (*Geotrichum candidum*), Amano APF (*Aspergillus niger*), Amano AK (*Pseudomonas* sp.), *Pseudomonas fluorescens* lipase (Biocatalyst Ltd), Amano Lipase P30 (*Pseudomonas* sp.), Amano P (*Pseudomonas Fluorescens*), Amano AY-30 (*Candida rugosa*), Amano N (*Rhizopus niveus*), Amano R (*Penicillium* sp.),
15 Amano FAP (*Rhizopus oryzae*), Amano Ap-12 (*Aspergillus Níger*), Amano MAP (*Mucor melhei*), Amano GC-4 (*Geotrichum candidum*), Sigma L-0382 y L-3126 (páncreas de cerdo), Lipase OF (Sepracor), Esterase 30.000 (Gist-Brocades) KID Lipase (Gist-Brocades), Lipase R (*Rhizopus* sp., Amano), Sigma L-3001 (germen de trigo), Sigma L-1754 (*Candida*
20 *cylindracea*), Sigma L-0763 (*Chromobacterium viscosum*) y Amano K-30 (*Aspergillus Níger*). Además, las enzimas ejemplares derivadas a partir de tejido animal incluyen esterasa de hígado de cerdo, quimiotripsina y pancreatina de páncreas tal como la Lipasa Pancreática Porcina (Sigma). Dos o más, así como una única enzima se pueden emplear cuando se
25 lleva a cabo el procedimiento de la presente invención.

El medio tampón puede ser tampones de sales de ácido inorgánico (por ejemplo dihidrógeno fosfato potásico, dihidrógeno fosfato sódico), tampones de sales de ácido orgánico (por ejemplo citrato sódico) o cualquier otro tampón apropiado. La concentración del tampón puede

121
121

variar entre 0,005 y 2M, preferiblemente entre 0,005 y 0,5 M y dependerá del compuesto sujeto específico y de las enzimas o microorganismos usados.

Un tensioactivo o una mezcla de tensioactivos se puede añadir a la
5 mezcla de reacción para solubilizar el sustrato. Los ejemplos de los tensioactivos apropiados incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos no iónicos, tales como alcoholes de alquilaril polietéter. Un tensioactivo de este tipo que se puede usar es octilfenoxi polietoxietanol, comercialmente disponible como Triton X-100 (de Sigma Chemical Company). Se usa una
10 cantidad eficaz de un tensioactivo. La cantidad usada puede variar entre el 0,05% y aproximadamente el 10%, dependiendo de factores tales como, pero sin limitarse a, la identidad del reactivo o reactivos, la identidad del producto o productos, los disolventes y/o codisolventes usados, y el procedimiento preferido para aislar el producto o productos deseados.

15 Si tal tensioactivo o tensioactivos son necesarios, la elección de un tensioactivo particular y la cantidad usada, son todas elecciones realizadas dentro del conocimiento de un experto en la técnica y se pueden determinar sin una experimentación indebida.

Se puede añadir una cantidad de un disolvente orgánico o una
20 mezcla de disolventes a la mezcla de reacción para incrementar la solubilidad del reactivo o del producto para facilitar la reacción. Los ejemplos de disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilsulfoxido, N,N-dimetilformamida, alcohol metílico, alcohol etílico, y alcohol isopropílico. Las cantidades
25 eficaces de un codisolvente están entre el 1% y aproximadamente el 50% dependiendo de los materiales de partida específicos y las enzimas y/o el microorganismo usado. Si tales disolventes son necesarios, la identidad del disolvente o disolventes, y la cantidad del disolvente usado son todas elecciones realizadas dentro del conocimiento de un experto en la técnica y

122
X22

se pueden determinar sin una experimentación indebida.

El pH de los tampones o el pH de las mezclas de reacción en la presente memoria descriptiva se puede mantener desde aproximadamente 4 a aproximadamente 10, desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, o desde aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La temperatura de reacción puede variar desde aproximadamente 0 a aproximadamente 100°C, y dependerá de la identidad de los materiales de partida, el biocatalizador usado, y el disolvente o las mezclas de disolventes usados. El tiempo de reacción va generalmente desde 1 hora a 400 horas y dependerá de la identidad de los materiales de partida, el biocatalizador usado, y el disolvente o la mezcla de disolventes usados. El progreso de reacción se puede controlar mediante un procedimiento analítico apropiado, tal como una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase inversa, espectroscopía de masa, espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica (NMR), o una combinación de técnicas, tal como cromatografía líquida/espectroscopía de masa (LC/MS). El estereoselectividad de la reacción se puede controlar o determinar usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tal como el uso de HPLC con una fase quiral estacionaria. La conversión de materiales de partida se puede llevar a cabo hasta aproximadamente el 50%, después de lo cual se puede aislar el producto ácido y el material de partida sin reaccionar.

La cantidad de enzima usada puede variar desde aproximadamente 5 unidades a aproximadamente 12.000 unidades de enzimas por mol de materiales de partida. La cantidad de enzima específica o mezcla de enzimas requerida dependerá de factores que incluyen, pero no se limita a, la temperatura, el compuesto sujeto específico, las enzimas y/o microorganismo usado, y el tiempo de reacción deseable. También puede ser deseable usar un exceso de enzimas o las enzimas en algunos casos

123
123

para obtener un tiempo de reacción prácticamente corto, especialmente cuando las enzimas se inmovilizan y se pueden reutilizar para muchos recambios. La concentración del sustrato de éster puede estar entre 0,1 g/l y 100 g/l y depende del compuesto sujeto específico y la enzima y/o el
5 microorganismo usados.

Las enzimas y/o los microorganismos usados en la presente invención pueden estar en forma bruta o en una forma inmovilizada. Pueden estar inmovilizados sobre diversos soportes sólidos sin pérdida de estereoespecificidad o cambio en la estereoselectividad. Los soportes
10 sólidos pueden ser absorbentes inertes a los que la enzima no está enlazada covalentemente. En su lugar la enzima es absorbida bien por interacciones de porciones hidrófobas o hidrófilas de una proteína con regiones similares del absorbente inerte, bien por enlace de hidrógeno, por formación de puente de sal, o por interacciones electrostáticas. Los
15 materiales absorbentes inertes incluyen, pero no se limita a, polímeros sintéticos (por ejemplo poliestireno, poli-(alcohol vinílico), polietileno y poliamidas), compuestos minerales (por ejemplo tierra diatomea y tierra de Fuller), o polímeros de origen natural (por ejemplo celulosa). Los ejemplos específicos de tales materiales incluyen tierra de diatomea Celite 545,
20 perlas de resina polimérica Abelite XAD-8 y polietilenglicol 8000.

La enzima se puede inmovilizar también sobre el soporte al que la enzima está enlazada covalentemente (por ejemplo perlas de oxirano-acrílico y soportes activados por glutaraldehído). Los ejemplos específicos incluyen perlas de oxirano-acrílico Eupergit C y Celite 545 activado por
25 glutaraldehído. Otros posibles sistemas de inmovilización son bien conocidos y están fácilmente disponibles para el experto en la técnica de la inmovilización de enzimas.

Los productos deseados, el éster sin reaccionar ópticamente puro (o enriquecido) y el ácido ópticamente puro (o enriquecido) se pueden aislar

124
A24

a partir de la mezcla de hidrólisis usando procedimientos convencionales tales como las extracciones, las extracciones de ácido-base, la filtración, la cromatografía, la cristalización o una combinación de los mismos. La enzima o el microorganismo recuperado se puede reciclar y usar en
5 posteriores reacciones con o sin una manipulación purificación adicional.

Los procedimientos para separar los productos finales de reacción unos de otros y de los componentes de reacción incluyen, pero no se limita a, la filtración, la destilación, la cromatografía líquida, la cromatografía en columna, la sublimación, la cristalización y la derivatización seguida por
10 cualquiera de los procedimientos anteriores. El procedimiento a elegir para efectuar la separación deseada dependerá de factores que incluyen, pero no se limita a, la identidad de los componentes de reacción, los materiales de partida, y los productos. Estas elecciones se realizan dentro del conocimiento de un experto en la técnica y se pueden hacer sin ninguna
15 experimentación indebida.

En un procedimiento de aislamiento apropiado, después de la hidrólisis enzimática, se ajusta el pH entre 7,5 y 8 (en el caso de biocatalizadores inmovilizados, el biocatalizador se separa en primer lugar por filtración), el producto ácido se separa del éster sin reaccionar
20 extrayendo el éster con un disolvente orgánico tal como cloruro de metileno, acetato de etilo, dietiléter, metil *t*-butiléter, o cualquier otro disolvente en el que el sustrato es soluble y estable. La concentración de los extractos orgánicos proporciona el material de partida sin reaccionar. La concentración de la fase acuosa produce el producto ácido.

25 El ácido se puede liberar de las sales tampón y la enzima por precipitación selectiva o cromatografía u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen acidificar la disolución acuosa a aproximadamente un pH 3, o menor, y aislar el ácido por extracción con un disolvente orgánico tal como cloruro de metileno, acetato

125
198

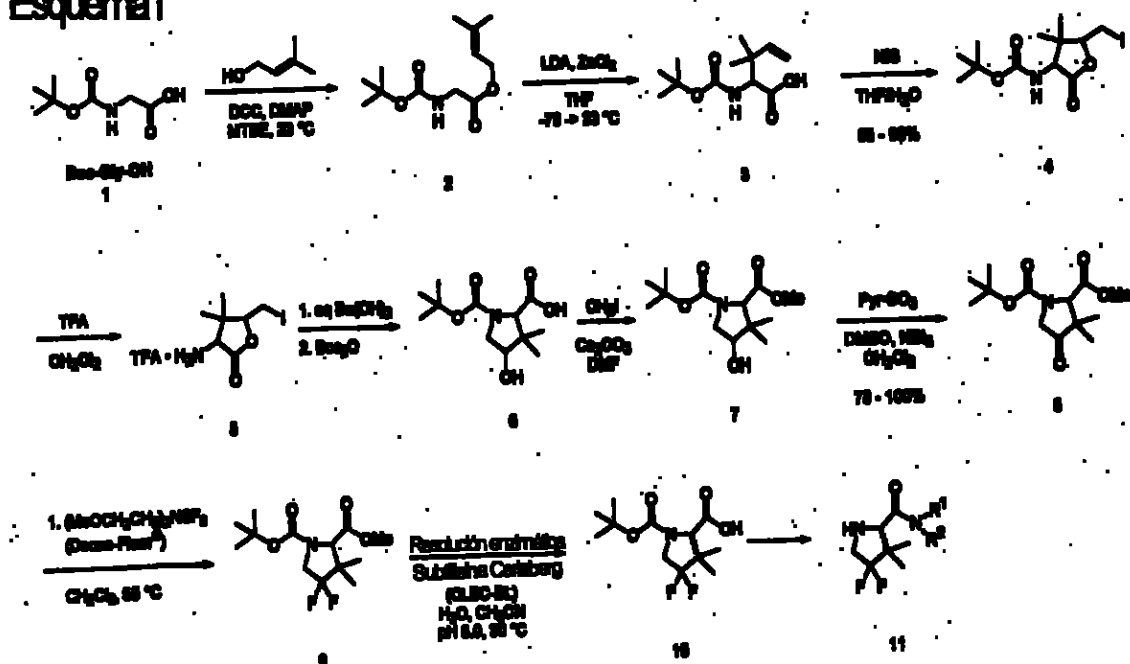
de etilo, dietiléter, metil t-butiléter, o cualquier otro disolvente en el que el ácido es soluble y estable. La concentración de los extractos orgánicos proporciona los materiales de partida sin reaccionar y el producto ácido, que se puede purificar y liberar de las sales tampón y la enzima por precipitación selectiva o cromatografía u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Bien el material de partida sin reaccionar enriquecido estereoisoméricamente o bien el producto enriquecido estereoisoméricamente se pueden además racemizar, si se desea. El material de partida sin reaccionar enriquecido estereoisoméricamente se puede racemizar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como calentándolo en presencia de una base y en presencia de un disolvente o disolventes apropiados. El producto enriquecido estereoisoméricamente se puede racemizar adicionalmente convirtiéndolo en un éster y calentándolo en presencia de una base y en presencia de un disolvente apropiado. El producto enriquecido estereoisoméricamente se puede convertir en un éster usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como calentando el producto en presencia de un alcohol y un ácido apropiado. De esta manera, cualquier estereoisómero de los compuestos de las fórmulas (I) y (II) se puede obtener en forma enriquecida estereoquímicamente.

Los compuestos de fórmula (II) se pueden preparar según el Esquema I mostrado a continuación.

126
126

Esquema I



En general, se puede empezar con un derivado de glicina N-
 5 protegido, tal como el compuesto 1, que se puede preparar a partir de
 glicina comercialmente disponible según procedimientos conocidos por los
 expertos en la técnica.

Se puede dejar que el derivado de glicina protegido 1 reaccione con un
 agente o una combinación de agentes aptos para la O-alkilación del
 10 grupo carboxilo terminal para obtener el compuesto 2. Los ejemplos de los
 agentes o las combinaciones de agentes que son conocidos por O-alkillar
 un grupo carboxilo incluyen, pero no se limita a, haluros de alquilo, ésteres
 de alquil sulfonato, y ésteres alquil trifluorometanosulfonato. Las
 reacciones se pueden llevar a cabo en presencia de una base que no
 15 interferirá con la transformación deseada. Tales bases incluyen, pero no se
 limita a, bases inorgánicas tales como carbonato sódico y carbonato
 potásico, y bases orgánicas tales como trietilamina o piridina.

127
129

Como alternativa, se puede dejar que los derivados de glicina N-
protegidos tales como el compuesto 1 reaccionen con un alcohol en
presencia de un agente o una combinación de agentes que convertirán el
grupo -OH en un grupo saliente apropiado. Los ejemplos de tales agentes
5 o la combinación de tales agentes incluyen, pero no se limitan a,
diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, clorhidrato de 1-[3-
(diméthylamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-
triazina (CDMT), cloruro cianúrico, cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-
2-il)-4-metilmorfolinio, hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-
10 ,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), carbonildimidazol (CDI),
hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris-(dimetilamino)-fosfonio (BOP),
2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), hexafluorofosfato de 2-
(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de
2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), y 3-
15 (dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DEPBT). Las reacciones
se pueden ejecutar en presencia de aditivos opcionales. Los aditivos
apropiados incluyen, pero no se limita a, hidroxibenzotriazol (HOBt),
hidroxiazabenzotriazol (HOAt), N-hidroxisuccinimida (HOSu), N-hidroxi-5-
norborneno-endo-2,3-dicarboximida (HONB), y 4-dimetilaminopiridina
20 (DMAP). Si estos aditivos son necesarios depende de la identidad de los
reactivos, el disolvente y la temperatura, y tales elecciones se realizan
dentro del conocimiento del experto de la técnica.

En general, estas reacciones se pueden realizar en un disolvente
que no interfiere con la reacción, por ejemplo éteres de alquilo o de arilo,
25 ésteres de alquilo o de arilo, hidrocarburos aromáticos y alifáticos,
alcoholes no competitivos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o de
arilo, cetonas de alquilo o de arilo, hidrocarburos aromáticos, o
hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo los disolventes apropiados,
incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo,

123
X08

acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida, propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo , ácido acético, dietil éter, metil-t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter, 5 tetrahydrofurano, 2-metiltetrahydrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo, acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se 10 puede usar agua como codisolvente en esta transformación si fuese necesario. Además, tales reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -20°C y 100°C , dependiendo de los reactivos, disolventes específicos y otros aditivos opcionales usados.

Los derivados de glicina O-alkilados, tales como el compuesto 2, 15 se pueden preparar también por reacción de los derivados de glicina protegidos con agentes o una combinación de agentes que convertirán el carboxilato en un derivado de haluro de acilo, seguido de la reacción con un alcohol apropiado. Por ejemplo, los compuestos que contienen un cloruro de acilo se pueden preparar a partir de los derivados de glicina 20 protegidos por reacción con agentes tales como cloruro de tionilo, o cloruro de oxalilo. Estas reacciones se pueden ejecutar en presencia de una base apropiada tal como carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, bicarbonato potásico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, una trialkilamina, por ejemplo trietilamina, o una base heteroaromática, por 25 ejemplo piridina. Los compuestos resultantes se pueden aislar y a continuación reaccionar adicionalmente con un alcohol apropiado o se pueden formar *in situ* y reaccionar con un alcohol apropiado sin ningún aislamiento o purificación adicional. Las reacciones se pueden realizar en un disolvente que no interfiere con la transformación deseada. Entre los

129
109

disolventes apropiados están los éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o arilo, cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes
5 apropiados incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida, propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo , ácido acético, dietil éter, metil-t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter,
10 tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo, acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se
15 puede usar agua como codisolvente en esta transformación si fuese necesario. Además, tales reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -20°C y 100°C . Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones se realizan dentro del conocimiento
20 del experto en la técnica.

Los derivados de glicina O-alkilados, tales como el compuesto 2, se pueden preparar también a partir del carboxilato por reacción con un agente o una combinación de agentes que convierte el grupo carboxilato en un acilimidazol, seguido de la reacción con un alcohol apropiado. Los
25 agentes apropiados para convertir el carboxilato en un acilimidazol incluyen, pero no se limitan a, carbonildiimidazol. Los intermediarios de acilimidazol se pueden aislar y a continuación reaccionar adicionalmente con un alcohol apropiado o se pueden formar *in situ* y reaccionar con un alcohol apropiado sin ningún aislamiento o purificación adicional. Las

130
12/2/20

reacciones se pueden realizar en un disolvente que no interfiere con la transformación deseada. Entre los disolventes apropiados están los éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o arilo, cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de diisopropilo, clorobenceno, dimetilformamida, dimetilacetamida, propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo, ácido acético, dietil éter, metil-t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo, acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se puede usar como codisolvente en esta transformación si fuese necesario. Además, tales reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -20°C y 100°C . Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones se realizan dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Los compuestos racémicos de fórmula (II), tales como el compuesto 3 mostrado en el esquema 1, se pueden preparar a partir de derivados de glicina que están O-alquilados con un grupo alilo o un derivado del mismo, tal como el compuesto 2. Se puede dejar que tales derivados de glicina O-alquilados reaccionen con un agente o una combinación de agentes de manera que el compuesto experimenta una transposición de tipo Claisen, para obtener los compuestos de fórmula (II). En general, estas reacciones se pueden realizar en un disolvente que no interfiere con la transformación

131
131

deseada. Entre los disolventes apropiados están los éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o arilo, cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida, propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo, ácido acético, dietil éter, metil-t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo, acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se puede usar agua como codisolvente en esta transformación si fuese necesario. Además, tales reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -78°C y 100°C . Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones se realizan dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Además, dichas transposiciones de Claisen se pueden promover formando en primer lugar un anión enolato de la especie que ha de experimentar la transposición. Tales aniones enolato se pueden preparar a partir de derivados de glicina O-alkilados por reacción con un agente o una combinación de agentes que pueden funcionar como una base fuerte. Por ejemplo, se puede dejar que tales derivados de glicina O-alkilados reaccionen con diisopropilamido de litio (LDA) para formar el anión enolato deseado. Tales reacciones se pueden realizar también en presencia de aditivos que son conocidos por promover tales reacciones,

132
132

tales como ácidos de Lewis como cloruro de zinc (II). Además, estas reacciones se pueden realizar en un disolvente que no interfiere con la transformación deseada. Entre los disolventes apropiados están los éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o arilo, cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida, propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo, ácido acético, dietil éter, metil-t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo, acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, tales reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -78°C y 100°C . Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones se realizan dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Los compuestos de fórmula (I), tales como el compuesto 10 mostrado en el Esquema I, se pueden preparar a partir de los compuestos de fórmula (II). En general los compuestos de fórmula (II) se pueden dejar que reaccionen con un agente electrófilo de halogenación para obtener una lactona, tal como el compuesto 4. Los agentes electrófilos de halogenación apropiados incluyen, pero no se limita a, N-clorosuccinimida (NCS), N-bromosuccinimida (NBS) y N-yodosuccinimida (NIS). Estas reacciones se pueden realizar en un disolvente o una mezcla de disolventes que no

53
X 32

interfieren con la transformación deseada. Entre los disolventes apropiados están los éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o arilo, cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o

5 hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida, propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo, ácido acético, dietil éter, metil-

10 t-butil éter; difenil éter, metilfenil éter, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo, acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una

15 mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se puede añadir agua a las mezclas de reacción si fuese necesario. Además, tales reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -78°C y 100°C . Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones

20 se realizan dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Las lactonas protegidas, tal como el compuesto 4 del esquema I, se pueden desproteger para proporcionar alfaamino lactonas tales como el compuesto 5. Tales reacciones de desprotección se pueden llevar a cabo usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y que se

25 encuentran por ejemplo en Greene *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley & Sons, Nueva York.

Las alfaamino lactonas, tales como el compuesto 5 se pueden dejar que reaccionen con un agente o una combinación de agentes de manera

134
134

que el compuesto experimente una transposición para obtener una amina
cíclica tal como el compuesto 6 mostrado en el esquema I. En general,
estas reacciones se pueden realizar permitiendo que un compuesto como
el compuesto 5 reaccione con un agente tal como hidróxido de bario. Estas
5 reacciones se pueden realizar en un disolvente o mezcla de disolventes
que no interfieren con la transformación deseada. Entre los disolventes
apropiados están los éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo,
hidrocarburos aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de
alquilo o arilo; cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o
10 hidrocarburos heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes apropiados
incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato
de isopropilo, acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter
de diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida,
propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo, ácido acético, dietil éter, metil-
15 t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter, tetrahydrofurano, 2-
metiltetrahydrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol,
etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol,
diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo,
acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una
20 mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se puede añadir
agua a las mezclas de reacción si fuese necesario. Además, tales
reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -78°C y 100°C .
Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del
compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones
25 se realizan dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Las aminas cíclicas, tales como el compuesto 5 se pueden aislar
como la carboxi amina libre, o se pueden derivatizar para facilitar el
aislamiento. Por ejemplo, como lo muestra el Esquema I, el compuesto 5
se deja reaccionar con hidróxido de bario en una mezcla de agua y un

135
28

disolvente orgánico para obtener la amina cíclica deseada. La amina cíclica se dejó reaccionar después con $(\text{BOC})_2\text{O}$ para obtener el compuesto 6, amina BOC-protégida.

Las aminas cíclicas, tales como el compuesto 6 se pueden dejar
5 después que reaccionen con un agente o una combinación de agentes
que sea capaz de O-alquilar el grupo carboxilato para obtener un éster tal
como el compuesto 7. Tales agentes se han descrito anteriormente e
incluyen, pero no se limitan a yoduro de metilo, éster metilsulfonato y
bromuro de metilo. Tales reacciones se pueden realizar en presencia de
10 un compuesto que sea capaz de actuar como una base. Las bases
apropiadas incluyen, pero no se limitan a, carbonato de cesio, carbonato
potásico y carbonato sódico. Además, las reacciones se pueden realizar en
un disolvente o mezcla de disolventes que no interfieren con la
transformación deseada. Entre los disolventes apropiados están los
15 éteres de alquilo o arilo, ésteres de alquilo o arilo, hidrocarburos
aromáticos y alifáticos, disolventes halogenados, nitrilos de alquilo o arilo,
cetonas de alquilo o arilo, hidrocarburos aromáticos, o hidrocarburos
heteroaromáticos. Por ejemplo, los disolventes apropiados incluyen, pero
no se limitan a, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo,
20 acetato de n-butilo, metil isobutil cetona, dimetoxietano, éter de
diisopropilo, clorobenceno, dimetil formamida, dimetil acetamida,
propionitrilo, butironitrilo, alcohol de t-amilo, ácido acético, dietil éter, metil-
t-butil éter, difenil éter, metilfenil éter, tetrahidrofurano, 2-
metiltetrahidrofurano, 1,4-dioxano, pentano, hexano, heptano, metanol,
25 etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, n-butanol, 2-butanol,
diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetonitrilo, benzonitrilo,
acetona, 2-butanona, benceno, tolueno, anisol, xilenos, y piridina, o una
mezcla cualquiera de los disolventes anteriores. Además, se puede añadir
agua a las mezclas de reacción si fuese necesario. Además, tales

126
136

reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas entre -78°C y 100°C . Las condiciones de reacción específicas elegidas dependerán del compuesto sujeto específico y de los reactivos elegidos. Tales elecciones se realizan dentro del conocimiento del experto en la técnica.

- 5 Los compuestos tales como el compuesto 7 se pueden resolver o preparar en forma enriquecida estereoquímicamente usando los procedimientos de la presente invención. Como alternativa, los compuestos tales como el compuesto 7 se pueden usar para preparar otros compuestos de fórmula (II) que se pueden resolver o preparar de forma
- 10 enriquecida estereoquímicamente según los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, el grupo hidroxilo secundario del compuesto 7 se puede oxidar para obtener la cetona correspondiente 8, mostrada en el Esquema I. Tales oxidaciones se pueden realizar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tal como la oxidación que usa
- 15 PCC, en condiciones de Swern, o usando $\text{pir-SO}_3/\text{DMSO}/\text{NEt}_3$. Los compuestos tales como el compuesto 8 se pueden resolver o preparar en forma enriquecida estereoquímicamente usando los procedimientos de la presente invención. Como alternativa, tales compuestos se pueden usar para preparar otros análogos que pueden por sí mismos resolverse o
- 20 prepararse en forma enriquecida estereoquímicamente usando los procedimientos de la presente invención

- Por ejemplo, las cetonas tales como el compuesto 8 se pueden dejar que reaccionen con un agente o una combinación de agentes que son capaces de convertir el grupo funcional cetona en un resto dihalo metileno,
- 25 tal como un grupo $-\text{CF}_2-$. Tales reacciones se pueden realizar usando agentes o combinaciones de agentes conocidos por los expertos en la técnica, tales como trifluoruro de (dietilamino)azufre (DAST) y otros. Por ejemplo, la reacción del compuesto 8 con $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NSF}_3$ (vendido como Deoxo-Fluor® por Air Products, Inc.) in diclorometano y a 55°C ,

137
132

proporcionó el compuesto difluoro 9.

Los compuestos tales como el compuesto 9 se pueden resolver o preparar en forma enriquecida estereoquímicamente usando los procedimientos de la presente invención. Como se muestra en el Esquema I, la reacción de una mezcla racémica del compuesto 9 con la enzima subtilisina Carlsberg en una mezcla de acetonitrilo y agua con un pH 8, y a 30°C, proporcionó el compuesto enriquecido estereoquímicamente 10. Los compuestos como el compuesto 10 que contiene un grupo protector de nitrógeno se pueden manipular adicionalmente retirando el grupo protector para obtener aminas secundarias cíclicas tales como el compuesto 11 mostrado en el Esquema I.

Como alternativa, los compuestos tales como 6, 7, 8, 9, y 10, mostrados en el esquema I, se pueden preparar en forma enriquecida estereoquímicamente resolviendo o preparando compuestos precursores tales como el compuesto 3, mostrado en el Esquema I, en forma enriquecida estereoquímicamente. Después de resolver o preparar los compuestos tales como el compuesto 3 en forma enriquecida estereoquímicamente, se pueden usar como se muestra para preparar compuestos de producto que están ellos mismos enriquecidos estereoquímicamente.

Los compuestos de fórmula (I), en la que Z es O o S, se pueden preparar según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase Mimoto, T. *Et al.*, J. Med. Chem. 1999, 42, 1789; el documento EP 0751145; las patentes de los Estados Unidos nº 5.644.028, 5.932.550, 5.962.640, 5.932.550 y 6.222.043, H. Hayahi *et al.*, J. Med. Chem. 1999, 42, 1789; y la publicación PCT nº WO 01/05230 A1, que se incorporan a modo de referencia en la presente memoria.

EJEMPLOS

138
138

Se entiende que los ejemplos expuestos a continuación sólo ilustran realizaciones particulares de la presente invención y en ningún caso limitan el alcance de la invención.

En los ejemplos descritos a continuación, a menos que se indique otra cosa, todas las temperaturas en la siguiente descripción están en grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$) y todas las partes y porcentajes son en peso a menos que se indique otra cosa.

Se adquirieron diversos materiales de partida y otros reactivos a partir de proveedores comerciales, tales como Aldrich Chemical Company o Lancaster Synthesis Ltd, y se usaron sin purificación adicional, a menos que se indique otra cosa.

Las reacciones expuestas a continuación se llevaron a cabo bajo una presión positiva de nitrógeno, argón o con un tubo secador, a temperatura ambiente (a menos que se establezca otra cosa), en disolventes anhidros. Se realizó la cromatografía analítica en capa fina sobre 254 placas a $15,56^{\circ}\text{C}$ de gel de sílice con apoyo de vidrio (Analtech (0,25 mm) y se eluyó con las relaciones de disolvente apropiadas (v/v). Las reacciones se ensayaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC) y se terminaron cuando se consideró que se había consumido el material de partida. Las placas de TLC se visualizaron por UV, coloración con ácido fosfomolibdico o coloración con yodo.

El espectro ^1H -NMR se registró en un instrumento Bruker que funciona a 300 MHz y el espectro ^{13}C -NMR se registró a 75 MHz. El espectro NMR se obtuvo en forma de soluciones de $\text{DMSO}-d_6$ o CDCl_3 (expresadas en ppm), usando cloroformo como norma de referencia (7,25 ppm y 77,00 ppm) o $\text{DMSO}-d_6$ ((2,50 ppm y 39,52 ppm)). Se usaron otros disolventes de NMR según las necesidades. Cuando se expresaron las multiplicidades de pico, se usaron las siguientes abreviaturas: s = singlete,

29
34

d= doblete, t = triplete, m = múltiplete, a = ancho, dd = dobletes de dobletes, dt = doblete de triplete. Las constantes de acoplamiento, cuando se dan, se expresan en hertzios

El espectro Infrarrojo se registró sobre un Espectrómetro Perkin-Elmer FT-IR en forma de aceites puros, bolitas de KBr, o soluciones de CDCl_3 , y cuando se expresan en número de ondas (cm^{-1}). El espectro de masas se obtuvo usando LC/MS o APCI. Todos los puntos de fusión están sin corregir.

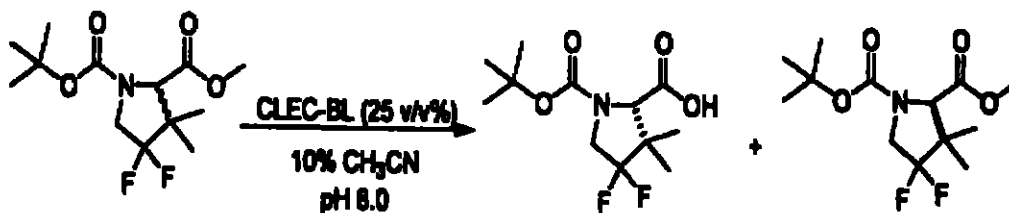
Todos los productos finales tuvieron una pureza superior al 95% (por HPLC con longitudes de onda de 220 nm y 254 nm).

En los siguientes ejemplos y preparaciones, "Et" representa etilo, "Ac" representa acetilo, "Me" representa metilo, "Ph" representa fenilo, $(\text{PhO})_2\text{POCl}$ representa clorodifenilfosfato, "HCl" representa ácido clorhídrico, "EtOAc" representa acetato de etilo, " Na_2CO_3 " representa carbonato sódico, "NaOH" representa hidróxido sódico, "NaCl" representa cloruro sódico, " NEt_3 " representa trietilamina, "THF" representa tetrahidrofurano, "DIC" representa diisopropilcarbodiimida, "HOBt" representa hidroxibenzotriazol, " H_2O " representa agua, " NaHCO_3 " representa hidrógeno carbonato de sodio, " K_2CO_3 " representa carbonato potásico, "MeOH" representa metanol, "i-PrOAc" representa acetato de isopropilo, " MgSO_4 " representa sulfato de magnesio, "DMSO" representa dimetilsulfoxido, "AcCl" representa cloruro de acetilo, " CH_2Cl_2 " representa cloruro de metileno, "MTBE" representa metil t-butil éter, "DMF" representa dimetilformamida, " SOCl_2 " representa cloruro de tionilo, " H_3PO_4 " representa ácido fosfórico, " $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ " representa ácido metanosulfónico, " Ac_2O " representa anhídrido acético, " CH_3CN " representa acetonitrilo, y "KOH" representa hidróxido potásico.

140
H2O

Ejemplo 1: Preparación de (2S)-2,4-difluoro-3,3-dimetil-N-Boc-prolina

5



A un reactor de 50 l equipado con un electrodo de pH, un agitador superior, una bobina de calentamiento y una línea de adición de base

10 (valorador de pH 718 Stat Titrino-Metrohm, Brinkman Instruments, Inc), se añadió la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, (Subtilisina Carlsberg, adquirido en Altus como CLEC-BL en forma de una solución al 6-14% en p/v) 7 l de CLEC fresco + 5 l de CLEC reciclado (el 80% de la actividad inicial) y 24 l de agua destilada). El pH de la suspensión se

15 ajustó a 8,0 mediante la adición de 20 ml de NaOH 2N. Una solución de éster racémico (400 g, 1,36 mol, 1,00 eq, en acetonitrilo, 3,6 l) se añadió a la suspensión y la mezcla se agitó 30°C durante 262 h. Durante el tiempo de reacción, el pH de la solución se controló y se mantuvo a un pH de 8 mediante la adición periódica de NaOH 2N (un total de 246 ml de base se

20 añadió durante la 262 horas del tiempo de reacción). El progreso de la reacción se controló usando la HPLC de fase inversa. La reacción se detuvo después de haber determinado que el 45-50% del material de partida se había consumido. El exceso enantiomérico (% de ee) del ácido se determinó que era el 95,5%. La mezcla de reacción se extrajo con

25 MTBE (3x con 16 litros), y las fases orgánicas combinadas se secaron

141

sobre Na_2SO_4 y se concentraron a vacío para obtener 220 g de éster I
escalémico en bruto, (R)-enriquecido. La suspensión acuosa restante se
filtró (para retirar el CLEC-BL) a través de papel Whatman 1. La pasta de
CLEC se retiró del papel y se almacenó a 4°C para, si se desea, un uso
5 posterior. La solución acuosa restante se acidificó a un pH 5,5 con ácido
clorhídrico 1N y se extrajo con MTBE (2 x 16 l cada uno). La solución
acuosa se extrajo de nuevo, con un pH 5,0 y con un pH 4,0. Las fracciones
orgánicas que contenían el producto ácido se combinaron y se
concentraron a vacío para obtener un residuo sólido. El residuo se
10 suspendió en agua caliente (40 – 50°C, 1.000 ml) y se dejó enfriar a
temperatura ambiente durante una noche. La suspensión resultante se
filtró y los cristales se secaron en un horno de vacío a 40°C durante una
noche para obtener el ácido en forma de un sólido blanco (133 g, 98% de
ee, rendimiento del 69,8% para la resolución cinética, > 98% de pureza por
15 HPLC). ^1H MNR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,9 (s ancho, 1H), 4,10 (d, 1H), 3,89
(dd, 2H), 1,5 (s) + 1,45 (s) (9H), 1,3 (s, 3H), 1,15 (s, 3H).

Los siguientes procedimientos analíticos se usaron para controlar el
progreso de reacción y medir el porcentaje de ee y la pureza del producto
final.

20

HPLC no quiral

Longitud de onda del detector: 200 nm

Columna: Luna C-18, 4,6 x 30 mm

Temperatura de la columna: 35°C

25 Caudal: 1,5 ml/min

Volumen de inyección: 10 μl

Fases móviles: A: KH_2PO_4 25mM pH 2,5; B: Acetonitrilo

Elución: gradiente: 35 a 70% de B en 5 minutos, 2 minutos después de la
elución

~~142~~
142

Tiempo de retención: Ácido 1,63; Éster 3,28

HPLC guirai

Longitud de onda del detector: 195 nm

5 Columna: Chiralcel OJR, 3µm, C-18, 4,6 x 150 mm

Temperatura de la columna: 40°C

Caudal: 0,5 ml/min

Volumen de inyección: 10µl

Fases móviles: A: KH₂PO₄ 25mM pH 2,0; B: Acetonitrilo; C: HPLC H₂O

10 Elución : isocrática: 75% de A y 25% de B durante 17 minutos, a continuación 75% de B y 25% de C durante 3 minutos, y finalmente 75% de A y 25% de B durante 15 minutos.

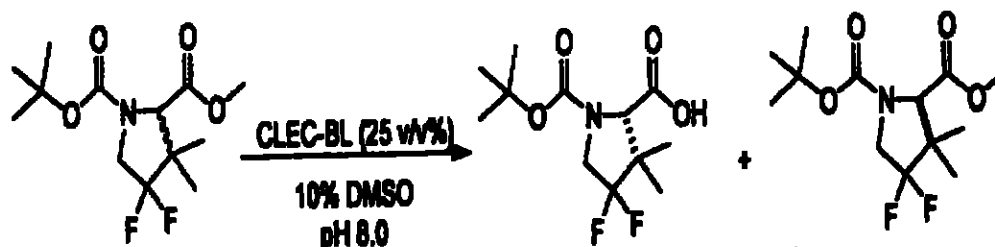
Tiempo de retención: Ácido 14,85(R) y 15,84(S)

15 Preparación de muestras

Se tomaron dos muestras cada vez que se realizó la toma de muestras. Cada muestra se preparó mezclando 10 ml de la mezcla de reacción y 10 ml de acetonitrilo. La solución se agitó con vortex y las fases se separaron por centrifugación sobre una centrifugadora Beckman. Se diluyeron adicionalmente, 100 µl de la fase superior con 400 µl de acetonitrilo y se inyectó en la HPLC.

Ejemplo 2: Preparación de (2S)-4,4-difluoro-3,3-dimetil-N-Boc-prolina

143



5

Una solución de éster racémico (3 g, 10,23 mmol, 1,00 eq, en DMSO, 15 ml) y tampón Tris 50 mM a un pH 8 (97,5 ml) se añadieron a un matraz de 3 bocas de 250 ml equipado con una sonda de temperatura, una barra agitadora, un electrodo de pH y una línea de adición de base. El pH de la mezcla era de aproximadamente 7,64. A continuación se añadió la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, (Subtilisina Carlsberg, adquirido en Altus como CLEC-BL en forma de una solución al 6-14% en p/v) (37,5 ml). Después de la adición de la enzima, el pH de la mezcla era aproximadamente 7,70. La mezcla resultante se calentó lentamente a 40°C usando una camisa de calentamiento. El pH de la mezcla se ajustó a pH 8,0 por la adición de hidróxido sódico 1N (0,848 ml). A medida que progresaba la reacción, se controlaba el pH de la mezcla de reacción y se mantuvo a pH 8 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1N (se añadió un total de 17,7 ml de NaOH 1N). La suspensión resultante se agitó a 40°C durante un total de 121 horas. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC de fase inversa controlando tanto la conversión y el porcentaje de ee del producto. La reacción se detuvo después de que el análisis por HPLC indicase que el 43% del material de partida se había

144

consumido. El porcentaje de ee del ácido se midió dando como resultado el 94,6% de ee.

La mezcla resultante se extrajo con MTBE (3 x 75 ml cada uno) y las fases orgánicas combinadas se filtraron a través del papel Whatman número 1 para retirar las partículas emulsionadas y para distinguir mejor el límite fase acuosa-orgánica. La fase acuosa asociada a la emulsión se volvió a añadir a las aguas madres. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a vacío para obtener 1,74 g de éster escalámico bruto I, (R)-enriquecido.

10 La suspensión acuosa restante se filtró (para retirar el CLEC-BL) a través de papel Whatman 1. La pasta de CLEC-BL se retiró del papel y se almacenó a 4°C para, si se desea, un uso posterior. La solución acuosa restante se acidificó a pH 5,3 usando HCL 1N y se extrajo con 80 ml de MTBE. La extracción se repitió cinco veces con el pH reducido a 5,3, 4,8, 15 4,0 y 3,9, respectivamente en las cuatro extracciones posteriores. Las fases orgánicas que contenían ácido se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a vacío para obtener 1,460 g de ácido bruto. Entonces el residuo sólido se resuspendió en 150 ml de MTBE. El ácido se lavó dos veces con 75 ml de tampón fosfato potásico 10mM con un pH 4,2- 20 4,5 para eliminar DMSO. Las fases orgánicas se secaron con Na_2SO_4 y se concentraron a vacío para obtener el ácido en forma de un sólido blanco (0,831 g, 98% de ee, rendimiento del 58% para la resolución cinética, > 98% de pureza por HPLC). ^1H MNR (300 MHz, CDCl_3): δ 5,3 (s ancho, 1H), 4,15 (d, 1H), 3,89 (dd, 2H), 1,5 (s) + 1,45 (s, 9H), 1,3 (s, 3H), 1,15 (s, 3H).

25 Los siguientes procedimientos analíticos se usaron para controlar el progreso de reacción y medir el porcentaje de ee y la pureza del producto final.

HPLC no quiral

12/5
14/5

Longitud de onda del detector: 200 nm

Columna: Luna C-18, 4,6 x 30 mm

Temperatura de la columna: 35°C

Caudal: 1,5 ml/min

5 Volumen de inyección: 10µl

Fases móviles: A: KH₂PO₄ 25mM pH 2,5; B: Acetonitrilo

Elución: gradiente: 35 a 70% de B en 5 minutos, 2 minutos después de la elución

Tiempo de retención: Ácido 1,63; Éster 3,28

10

HPLC quiral

Longitud de onda del detector: 195 nm

Columna: Chiralcel OJR, 3µm, C-18, 4,6 x 150 mm

Temperatura de la columna: 40°C

15 Caudal: 0,5 ml/min

Volumen de inyección: 10µl

Fases móviles: A: KH₂PO₄ 25 mM pH 2,0; B: Acetonitrilo; C: HPLC H₂O

Elución : isocrática: 75% de A y 25% de B durante 17 minutos, a continuación 75% de B y 25% de C durante 3 minutos, y finalmente 75% de A y 25% de B durante 15 minutos.

20

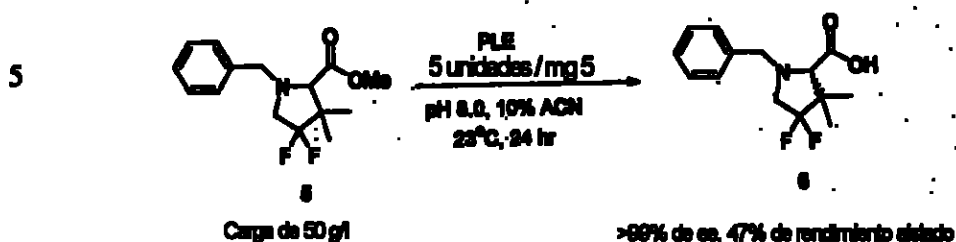
Tiempo de retención: Ácido 14,85(R) y 15,84(S)

Preparación de muestras

Se tomaron dos muestras cada vez que se realizó la toma de
25 muestras. Cada muestra se preparó diluyendo 100 µl de la mezcla de reacción con 1,9 ml de acetonitrilo. La solución se agitó con vortex y 1 ml de esta solución se centrifugó en una centrífugadora Beckman. La fase superior se inyectó en la HPLC.

146

Ejemplo 3: Resolución de N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster



A N-terc-butoxicarbonil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster (5,0 g, 17,0 mmol) se añadió HCl 4M (2,0 eqv, 8,5 ml) en dioxano. La mezcla se agitó a 0°C durante 3 horas. Después de considerar que la reacción se había terminado por HPLC, se retiró a vacío el dioxano y el exceso de HCl para obtener el residuo bruto. El residuo bruto se lavó con MTBE (3 ml x 2) y se secó en un horno para proporcionar 3,8 g de 4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster sólido (~ 95% de pureza), que se usó en la siguiente reacción sin ninguna purificación adicional.

A 3,8 g de 4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster se añadió K₂CO₃ (3,8 g), MeOH (60 ml) y BnBr (1,1 eqv, 2,55 ml). La mezcla resultante se agitó a 23° durante 20 horas. La mezcla se filtró y se retiraron los disolventes a vacío, dejando un residuo. El residuo se disolvió en MTBE (60 ml) y se lavó con HCl 1N (20 ml x 3), NaHCO₃ (20 ml x 3) y salmuera (20 ml x 1). Las fases orgánicas se combinaron, secaron sobre Na₂SO₄, y se retiraron los disolventes a vacío para obtener 4,3 g (rendimiento del 90%) de N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster.

El éster racémico (3,0 g, 10,6 mmol) se disolvió en acetonitrilo (9 ml, 15%) y se añadió el tampón fosfato potásico (pH 8,0, 0,1M, 60 ml). Se añadió esterasa de hígado de cerdo (750 mg, 10~15 unidades/mg) y el pH de la solución se mantuvo a pH 8 con la adición periódica de NaOH 1N.

El progreso de la reacción se controló por HPLC de fase Inversa.

147
147

Después de 20~24 horas, se alcanzó el ~50% de la conversión y el pH de la mezcla se ajustó a pH 8,3-8,4 por la adición de NaOH 1N y se extrajo la solución con MTBE (40 ml x 3). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para obtener el R-éster 5 restante (1,56 g, ~52%). El pH de la
5 fase acuosa restante se ajustó a pH 3,5 por la adición de HCl 1N y se extrajo con MTBE (40 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, y se retiraron los disolventes a vacío para obtener N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina (1,35 g, 47%).

4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster: ESI [M+H]⁺ 194,1. ¹H NMR
10 (300 MHz, D₂O): δ4,48 (s, 1H), 3,77-3,98 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 1,30 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), ¹³C NMR (75 ppm, D₂O) δ167,70, 66,43, 66,38, 54,52, 48,59, 45,94, 17,64, 17,02.

N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster ESI [M+H]⁺ 284,1.
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7,23-7,40 (m, 5H), 3,94 (d, J = 13,2 Hz, 1H),
15 3,48 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 3,39 (s, 1H), 3,39 (s, 1H), 3,35 (dd, J = 10,6, 20,0 Hz, 1H), 2,85 (ddd, J = 6,6, 11,4, 18,3 Hz, 1H), 1,22 (s, 3H), 1,07 (s, 3H).
¹³C NMR (75 ppm, CDCl₃) δ171,42, 138,20, 128,87, 128,73, 127,73, 74,18, 58,72, 51,98, 47,06, 33,82, 20,16, 18,96.

N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina ESI [M-H]⁻ 268,1. ¹H NMR
20 (300 MHz, CDCl₃): δ7,26-7,40 (m, 5H), 3,94 (d, J = 12,9 Hz, 1H), 3,66 (d, J = 12,9 Hz, 1H), 3,32-3,57 (s, 2H), 3,05 (m, 1H), 1,26 (s, 3H), 1,11 (s, 3H).
¹³C NMR (75 ppm, CDCl₃) δ171,10, 136,19, 129,16, 128,68, 127,73, 74,83, 60,67, 56,49, 53,75, 46,48, 20,40, 18,77.

Se usaron los siguientes procedimientos analíticos:

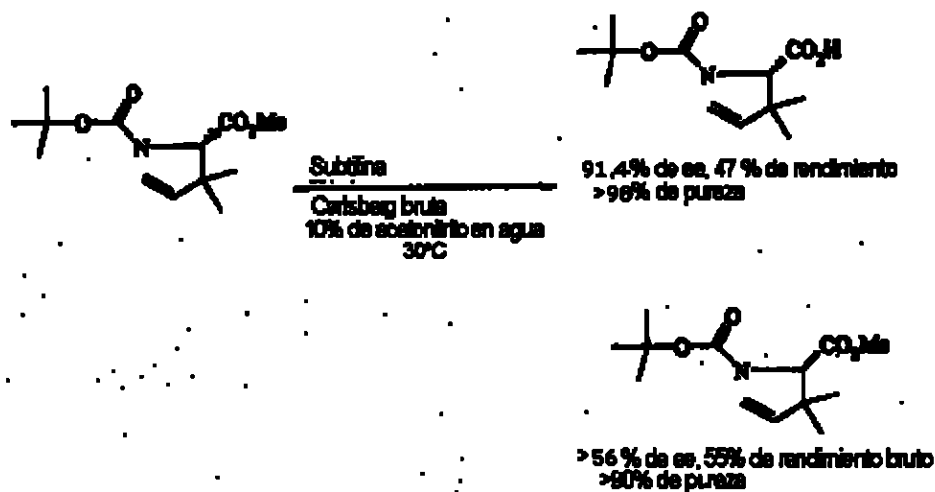
25 N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina metil éster: Chiralcel AD-RH (4,6 x 100 mm, 3 μm), caudal: 0,6 ml/min, volumen de inyección: 5μl, fases móviles: ACN/H₂O (20:80), detección a 254 nm.

N-bencil-4,4-difluoro-3,3-dimetilprolina: Chiralcel OD-RH (4,6 x 100 mm, 3 μm), caudal: 0,6 ml/min, volumen de inyección: 5μl, fases móviles:

148
148

ACN/H₂O (60:40), detección a 254 nm

Ejemplo 4: Preparación de (S)-3,3-dimetil-N-Boc-vinilglicina



5

A un matraz de 5 litros y 3 bocas equipado con un electrodo de pH,
un agitador superior, una camisa de calentamiento y una línea de adición
de base, se añadió el éster racémico I (78 g, 0,3 mol, 1,00 eq) en
acetónitrilo (280 ml).

En un recipiente separado se añadió Alcalasa (350 ml de una
solución que se pasó a través de un sistema de filtración tangencial y se
concentró a un quinto de su volumen original) y agua destilada (2,8 l). El
pH de la solución resultante se ajustó a pH 7,0. La solución de enzima se
añadió al matraz que contiene la solución de éster. La suspensión
resultante se agitó a 30°C durante 51 horas, durante cuyo tiempo el pH de
la solución se mantuvo a 7,0 mediante la adición periódica de NaOH 1N
(un total de 95,8 ml de base añadidos durante 51 horas). El progreso de la

~~216~~
149

reacción fue seguido por HPLC de fase inversa y la reacción se detuvo después de haber determinado que el 45% del material de partida se había consumido.

- Se extrajo la mezcla con MTBE (3 x 1,75 l cada una) y las
- 5 fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a vacío para obtener 50,81 g de éster escalémico l bruto, (R) –enriquecida (>55% del rendimiento, aproximadamente 56% de ee). Esta mezcla bruta contenía algo de ácido carboxílico <7%, que se recuperó más tarde mediante extracción ácido-base. La solución acuosa restante se pasó a
- 10 través de una filtración de flujo tangencial Pellicon 2 equipado con una membrana de celulosa Ultracel. La solución restante se acidificó a pH 4,0 y se extrajo con MTBE (3 x 1,75 l). Las fracciones que contenían el ácido se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron a vacío para obtener un aceite amarillo claro (31 g, 91,4 % de ee, 42% de
- 15 rendimiento, >98 % de pureza por HPLC), $^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10,69 (s, 1H), 5,78 (dd, 2H), 5,02 (m, 2H), 4,96 (s, 1H), 4,09 (d, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,06 (s, 6H).

Se usaron las siguientes condiciones analíticas

HPLC no quiral

- 20 Longitud de onda del detector: 200 nm
Columna: Luna C-18, 4,6 x 30 mm
Temperatura de la columna: 35°C
Caudal: 1,5 ml/min
Volumen de inyección: 10 μl
- 25 Fases móviles: A: KH_2PO_4 25mM pH 2,5; B: Acetonitrilo
Elución: gradiente: 30 a 70% de B en 5 minutos, 2 minutos antes de la elución
Tiempo de retención: Ácido 1,63; Éster 3,28

150
150

HPLC quiral

Longitud de onda del detector: 200 nm

Columna: Chiralcel OJR, 3 μ m, C-18, 4,6 x 100 mm

Temperatura de la columna: no controlada

5 Caudal: 0,5 ml/min

Volumen de inyección: 10 μ l

Fases móviles: A: NaH₂PO₄ 25 mM pH 2,0; B: Acetonitrilo;

Elución : isocrática: 25% de B durante 55 minutos, 3 minutos después de la elución.

10 Tiempo de retención: Ácido 16,33(R) y 17,97(S); Ester 50.40 (S), 51,30 (R).

Procedimiento para analizar ee de éster puro:

Columna: Chiralcel OD.RH, 150 x 4,6 mm

Caudal: 0,8 ml/minuto

15 Temperatura: 30°C

Fase móvil: 30% de ACN y 70% de H₂O

Longitud de onda: 205 nm

Preparación de muestras

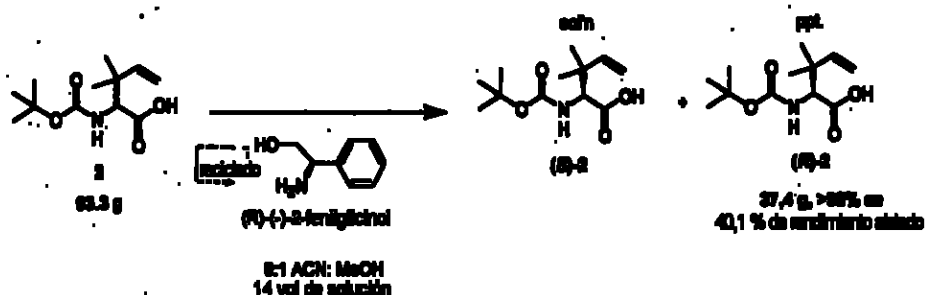
20 Se tomaron dos muestras cada vez que se realizó la toma de muestras. Cada muestra se preparó tomando 2 x 200 μ l de la mezcla de reacción y se diluyó con 1 ml de acetato de etilo y 100 μ l de HCl 1H, a continuación se agitó con vortex y las fases se separaron por centrifugación en una centrifugadora Beckman. Se diluyeron
25 adicionalmente, 100 μ l de la fase superior (orgánica) con 400 μ l de acetonitrilo/agua (1:1) y se inyectó en la HPLC.

Ejemplo 5: Preparación de (R)-3,3-dimetil-N-Boc-vinilglicina

151

5

10



A un matraz de 2000 ml con camisa y equipado con un agitador superior se añadió el ácido racémico 2, 3,3'-dimetil-N-Boc-vinilglicina, (93,3 g, 386,2 mmol, 1,00 Eq), (R)-fenilglicinol (52,6 g, 386,2 mmol, 1,00 eq), metanol (200 ml) y acetonitrilo (1.800 ml). La suspensión resultante se agitó y se calentó a 70-80°C hasta que la solución se volvió homogénea. La solución se dejó que se enfriase lentamente a temperatura ambiente con agitación continua, dando como resultado su cristalización. La suspensión resultante se filtró y la sal cristalina (que contiene el (R)-enantiómero deseado) se lavó con 100 ml de acetonitrilo frío, se recogió y se analizó con HPLC. En los casos en que se desea mejorar el porcentaje de ee del producto resultante después de la primera cristalización, se puede realizar una segunda cristalización.

La sal se convirtió entonces en el ácido libre disolviendo la sal en 250 ml de acetato de etilo (como alternativa, se puede usar MTBE en lugar del acetato de etilo). Se añadió agua (250 ml) y el pH de la solución resultante se ajustó a pH 3 mediante la adición de ácido clorhídrico 1N. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (200 ml). Los extractos se combinaron, se secaron sobre sulfato

152
152

sódico, y se concentraron a vacío para obtener un aceite transparente que se secó durante una noche a vacío para obtener un sólido blanco (37,4 g, > 98% de ee, 40,1% de rendimiento global aislado, >98% de pureza).

5 Reciclaje de (R)-fenilglicinol.

El pH de la fase acuosa de la etapa anterior se ajustó a pH 8,0 mediante la adición de hidróxido sódico 1N y la solución se extrajo con 300 ml de acetato de etilo (o MTBE). A continuación el extracto se secó con sulfato sódico y se concentró a vacío. El producto se aisló en forma de cristales blancos (12,3 g, > 98% de pureza, obsérvese que la recuperación sólo fue del 40% del material, el agente recristalizante restante se puede recuperar a partir del filtrado generado en la etapa 4).

Se usaron las siguientes condiciones analíticas:

15

HPLC no quiral

Longitud de onda del detector: 205 nm

Columna: Chiralcel OJ-RH, 3µm C-18, 4,6 x 100 mm

Temperatura de la columna: 30°C

20 Caudal: 0,6 ml/min

Volumen de inyección: 10µl

Fases móviles: A: Acetonitrilo (0,1% de TFA): B: 75% H₂O (0,1% de TFA).

Elución :isocrática: 25% de A: 75% de B 18 minutos

Tiempo de retención: Ácido 11,69 (R) y 12,9 (S) / 5,3 R-fenilglicinol

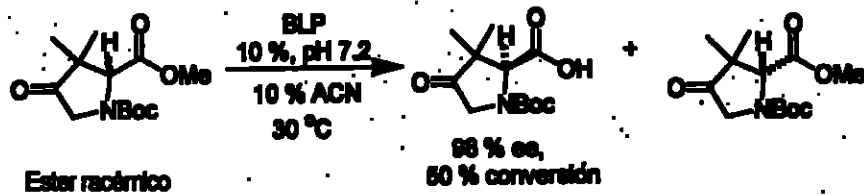
25

Ejemplo 6: Preparación de (2S)-4-oxo-3,3-dimetil-N-Boc-prolina

30

153 153

5



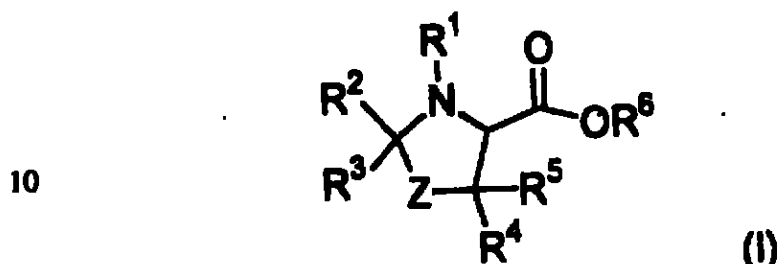
- 10 Se suspendieron 10 mg de éster racémico en 100 microlitros de acetonitrilo y se añadió a 900 ml de tampón KPB que contiene proteasa de *Bacillus lentus* (BLP) al 10%. La reacción se detuvo después de 16 horas, dando como resultado una conversión al 50% y >98% de ee del producto ácido (2S)-4-oxo-3,3-dimetil-N-Boc-prolina. El Amano proleather FGF fue otro
- 15 candidato, el cual se descubrió que realiza la reacción con una reactividad y enantioselectividades similares.

161/51

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I)



en la que

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o -(CR⁷R⁸)-;

- 15 R¹ es hidrógeno, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R⁷, -C(O)OR⁷, -C(O)C(O)OR⁷ o -Si(R⁷)₃, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷ y -N(R⁷R⁸);

- 20 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

- 25 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR⁷R⁸)_n(arilo C₆-C₁₄) y -(CR⁷R⁸)_n(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR⁷, y -N(R⁷R⁸);

5/8

R^6 es hidrógeno;

R^7 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^9R^9)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^9R^9)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la

5 que el arilo C_6-C_{14} y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$;

cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

10 t es un número entero de 0 a 5;

comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (I), en la que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son tal como se han definido anteriormente y R^6 se selecciona de alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^7R^8)_t$ (arilo C_6-C_{14}) y

15 $-(CR^7R^8)_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se

20 hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el compuesto de fórmula (I)

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o $-(CR^7R^8)_t$;

25 R^1 es $-(CH_2)$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-CH=CH_2$, $-C(O)OR^7$ o $-C(O)C(O)OR^7$, en la que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 y $-N(R^7R^8)$;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo,

60/56

etilo, butilo y pentilo;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, metilo etilo, butilo y pentilo;

R^6 es hidrógeno;

- 5 R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , y arilo C_6-C_{14} , en el que dicho arilo C_6-C_{14} está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , $-OR^9$, y $-N(R^9R^9)$; y

10 cada R^9 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} .

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el compuesto de fórmula (I)

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o $-(CR^7R^8)-$;

- 15 R^1 es $-CH_2Ph$, $-C(O)OR^7$ o $-C(O)C(O)OR^7$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^6 es hidrógeno; y

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo

20 C_1-C_{10} .

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el compuesto de fórmula (I)

Z es O, S, C=O, C=CH₂, o $-(CR^7R^8)-$;

- 25 R^1 es $-CH_2Ph$, $-C(O)OCH_3$, $-C(O)OC(CH_3)_3$ o $-C(O)C(O)OCH_3$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo;

R^6 es hidrógeno; y

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, flúor,

157 157

metilo y $-\text{OCH}_3$.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el compuesto de fórmula (I)

5 Z es S;

R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 son metilo; y

R^6 es hidrógeno.

10

6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el compuesto de fórmula (I)

Z es $-(\text{CR}^7\text{R}^8)-$;

15 R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$;

R^2 y R^3 son hidrógeno;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno y metilo, etilo, butilo y pentilo;

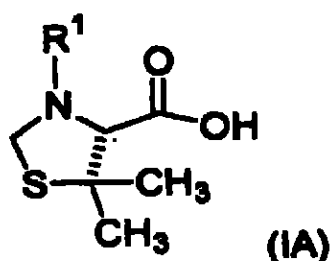
20 R^6 es hidrógeno; y

R^7 y R^8 se seleccionan independientemente de hidrógeno, flúor, cloro, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ y alcoxy $\text{C}_1\text{-C}_{10}$.

7.- Un procedimiento para preparar un compuesto enriquecido
25 estereoisoméricamente de fórmula (IA)

150 750

5



en la que

10

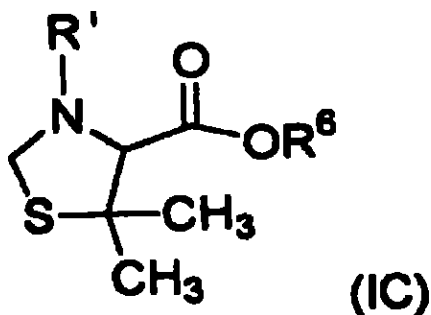
R^1 es $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$, o $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$; y

R^7 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$;

comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (IC),

15

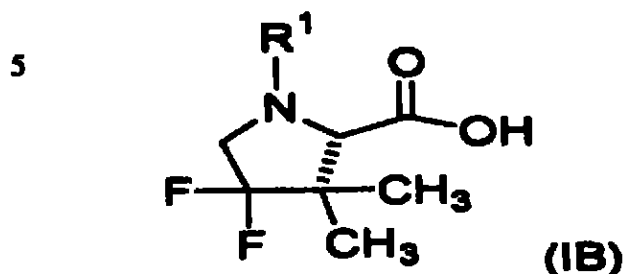


20

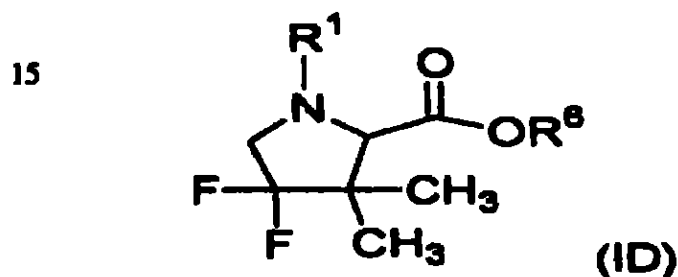
en la que R^1 , es tal como se ha definido anteriormente y R^6 se selecciona de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-\text{CH}_2(\text{arilo } \text{C}_6\text{-C}_{14})$ y $-\text{CH}_2(\text{heterociclo de 4-10 miembros})$, y en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, OR^7 , y $-\text{N}(\text{R}^7\text{R}^7)$, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

159
X51

8.- Un procedimiento para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IB)



10 en la que R¹ es -CH₂Ph, -C(O)-OR⁷ o -C(O)c(O)O R⁷; y
R⁷ es alquilo C₁-C₁₀
comprendiendo dicho procedimiento:
tratar un compuesto de fórmula (ID),

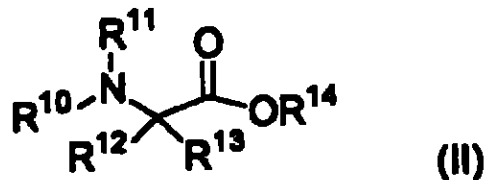


20 en la que R¹, es tal como se ha definido anteriormente y R⁸ se
selecciona de alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -CH₂(arilo
C₆-C₁₄) y -CH₂(heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C₆-
C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos
con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR⁷, y
25 -N(R⁷R⁷), con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente
orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se
hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

9.- Un procedimiento para preparar un compuesto enriquecido

160 160

estereoisoméricamente de fórmula (II)



en la que

R^{10} es hidrógeno, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_n$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$), $-\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{15}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{OR}^{15}$ o $-\text{Si}(\text{R}^{15})_3$, en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, OR^{15} , y $-\text{N}(\text{R}^{15}\text{R}^{16})$;

R^{11} es hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquino $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_n$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) o $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_n$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, $-\text{OR}^{15}$, y $-\text{N}(\text{R}^{15}\text{R}^{16})$;

R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquino $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_n$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) y $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_n$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, $-\text{OR}^{15}$, y $-\text{N}(\text{R}^{15}\text{R}^{16})$, siempre que R^{12} y R^{13} no puedan ser ambos hidrógeno;

R^{14} es hidrógeno;

R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente de, hidrógeno, halo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, alquino $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $-(\text{CR}^{17}\text{R}^{17})_n$ (arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$) y $-(\text{CR}^{17}\text{R}^{17})_n$ (heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de

161
161

halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁷, y -N(R¹⁷R¹⁷);

cada R¹⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 0 a 5;

5 comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (II), en la que R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ son tal como se han definido anteriormente y R¹⁴ se selecciona de alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR¹⁵R¹⁶)_t(arilo C₆-C₁₄) y -(CR¹⁵R¹⁶)_t(heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C₆-C₁₄ y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR¹⁵, y -N(R¹⁵R¹⁶), con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

15

10.- Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que en el compuesto de fórmula (II):

R¹⁰ es -C(O)OR¹⁵ o -C(O)C(O)OR¹⁵;

R¹¹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀;

20 R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, siempre que R¹² y R¹³ no puedan ser ambos hidrógeno;

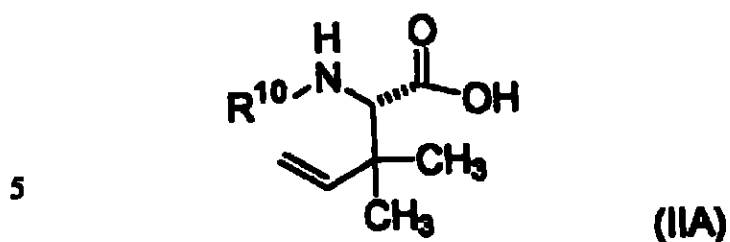
R¹⁴ es hidrógeno; y

R¹⁵ es alquilo C₁-C₁₀;

25

11.- Un procedimiento para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (IIA)

162



en la que

R^{10} se selecciona de hidrógeno, $-(CR^{15}R^{16})_t$ (arilo C_6-C_{14}), $-CH_2-$
 10 $CH=CH_2$, $-C(O)R^{16}$, $-C(O)OR^{15}$ y $-C(O)C(O)OR^{16}$;

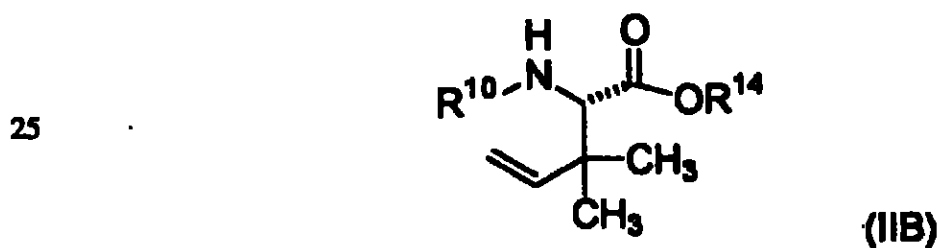
R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de
 hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} ,
 $-(CR^{17}R^{17})_t$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^{17}R^{17})_t$ (heterociclo de 4-10 miembros), en
 la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están
 15 opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de
 halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^{17} , y $-N(R^{17}R^{17})$;

cada R^{17} se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo
 C_1-C_{10} ; y

t es un número entero de 0 a 5;

20 comprendiendo dicho procedimiento:

tratar un compuesto de fórmula (IIB),



en la que R^{10} es tal como se define anteriormente y R^{14} es alquilo

163

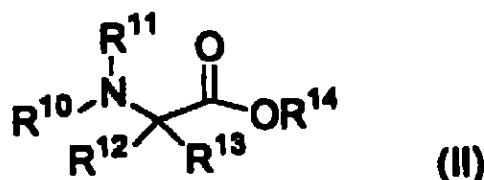
C₁-C₁₀, con un biocatalizador en un disolvente acuoso, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

5 12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho biocatalizador se selecciona de una proteasa alcalina, una esterasa, una lipasa, una hidrolasa y una combinación cualquiera de las mismas.

10 13.- Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho biocatalizador se selecciona de *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus subtilis* y esterasa de hígado de cerdo.

14.- Un procedimiento para la resolución de un compuesto de fórmula (II)

15



20

en la que

R¹⁰ es hidrógeno, -(CR¹⁵R¹⁶)₇(arilo C₆-C₁₄), -CH₂-CH=CH₂, -C(O)R¹⁵, -C(O)OR¹⁵, -C(O)C(O)OR¹⁵ o -Si(R¹⁵)₃, en la que dicho arilo C₆-C₁₄ está opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente
25 seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, OR¹⁵, y -N(R¹⁵R¹⁶);

R¹¹ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR¹⁵R¹⁶)₈(arilo C₆-C₁₄) o -(CR¹⁵R¹⁶)₉(heterociclo de 4-10 miembros), en la que dicho arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de

16/12/16

halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁵, y -N(R¹⁵R¹⁶);

R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR¹⁵R¹⁶)_t(arilo C₆-C₁₄) y -(CR¹⁵R¹⁶)_t(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el
5 heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁵, y -N(R¹⁵R¹⁶), siempre que R¹² y R¹³ no puedan ser ambos hidrógeno;

R¹⁴ es hidrógeno;

R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente de, hidrógeno, halo
10 alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, -(CR¹⁷R¹⁷)_t(arilo C₆-C₁₄) y -(CR¹⁷R¹⁷)_t(heterociclo de 4-10 miembros), en la que el arilo C₆-C₁₄ y el heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C₁-C₁₀, -OR¹⁷, y -N(R¹⁷R¹⁷);

15 cada R¹⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀; y

t es un número entero de 0 a 5;

comprendiendo dicho procedimiento:

(i) tratar un compuesto de fórmula (II), en la que R¹⁰, R¹¹, R¹²,
20 R¹³ y R¹⁴ son tal como se han definido anteriormente, con una base quiral no racémica para obtener una mezcla de sales diastereoméricas;

(ii) separar dichas sales diastereoméricas entre sí, y

(iii) convertir dicha sal diastereomérica en un compuesto
25 enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (II).

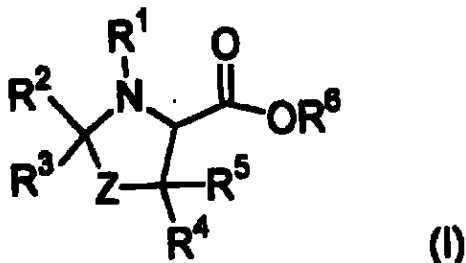
15.- Un procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha base quiral no racémica es (R)-(-)-2-fenilglicinol o (S)-(+)-2-fenilglicinol

165

RESUMEN

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar un compuesto enriquecido estereoisoméricamente de fórmula (I)

5



10

en la que R^6 es hidrógeno; que comprende tratar un compuesto de fórmula (HI), en la que R^6 se selecciona de alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , $-(CR^7R^8)_1$ (arilo C_6-C_{14}) y $-(CR^7R^8)_1$ (heterociclo de 4-10 miembros), y en la que dicho arilo C_6-C_{14} y dicho heterociclo de 4-10 miembros están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C_1-C_{10} , OR^7 , y $-N(R^7R^8)$, con un biocatalizador en una solución acuosa, un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes orgánico y acuoso en la que se hidroliza selectivamente al menos un estereoisómero.

15

20

166
166

TRATAD DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F., Jr.
PFIZER, Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
Estados Unidos de América.

Sello de Recibido 12 de diciembre de 2005, MOPS IP GLBL SRVS

Fecha de expedición: 06.12.2005
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC26187A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/003812
Fecha de presentación internacional: 22.11.2004
Fecha de prioridad: 04.12.2003
Solicitante: PFIZER INC et. al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39 (1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de

informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

167
167

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea

D-80298 - Munich

Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d

Fax: +49-89 2399 - 4465.

Funcionario Autorizado: Ambroa, J.R.

Tel: + 49 89 2399-8012

~~1/18~~
68

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC26187A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/003812
Fecha de presentación internacional: 22.11.2004
Fecha de prioridad: 04.12.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: C07D 207/16, C07D 207/24, C07C 271/22, C12P 13/24.
Solicitante: PFIZER INC et. al.

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
 - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de hojas, descritas a continuación:
 - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
 - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
 - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

169
169

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☒ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☒ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☒ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 17.02.2005
Fecha de elaboración de este reporte: 06.12.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:
Oficina de Patentes Europea
D-80298 – Munich
Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: +49-89 2399 – 4465.

Funcionario Autorizado: Scruton-Evans, I
Tel: + 49 89 2399-8272

no
12/3

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 51 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

- 17A
171
- ☐ la descripción, páginas
 - ☐ las reivindicaciones, Nos.
 - ☐ los dibujos, hojas/fig.
 - ☐ la lista de secuencias (especificar):
 - ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
- ☒ a las reivindicaciones Nos. 14, 15

debido a que:

- ☐ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):
- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☒ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 14, 15
- ☐ la lista de de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

La lista en papel ☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar

La lista en formato legible por ordenador
☐ no se presentó

172

- ☐ no cumple con la norma estándar
- ☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos, si únicamente se han presentado en formato legible por ordenador, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver recuadro suplementario para más detalles.

Recuadro No. IV	Falta de unidad de invención
------------------------	-------------------------------------

1. ☒ En respuesta al requerimiento para limitar las reivindicaciones o pagar tasas adicionales, el solicitante:
- ☐ ha limitado las reivindicaciones
- ☐ ha pagado tasas adicionales
- ☐ ha pagado tasas adicionales bajo protesta
- ☒ no ha limitado las reivindicaciones ni pagado las tasas adicionales.
2. ☐ Esta Administración considera que no se cumple la exigencia de unidad de la invención por los motivos indicados a continuación, y con forme a la Regla 68.1, decide no requerir al solicitante para limitar las reivindicaciones o pagar tasas adicionales.
3. Esta Administración considera que el requerimiento de unidad de invención según las reglas 13.1, 13.2 y 13.3:
- ☐ se cumple
- ☐ no se cumple por las siguientes razones:

Ver hoja adjunta

4. En consecuencia, el presente informe se ha establecido con relación a las partes siguientes de la solicitud internacional:
- ☐ todas las partes de la solicitud
- ☒ las partes relativas a la reivindicaciones Nos. 1-13.

**Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35 (2)
con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial:
anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración**

123

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1, 12, 13
Nivel Inventivo (NI)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1 - 13
Aplicación Industrial (AI)	Si:	Reivindicaciones 1 - 13
	No:	Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

o

Recuadro No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Regla 70.10)

y/o

2. Divulgaciones no escritas (Regla 70.9)

Ver hoja adjunta

17/11
17/11

Ítem III

No formulación de concepto con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

Las reivindicaciones 14 y 15 no fueron objeto de búsqueda (ver el Ítem IV a continuación) y por lo tanto no se formulará concepto alguno para estas reivindicaciones.

Ítem IV

Carencia de Unidad de Invención

Las reivindicaciones 1-13 se relacionan con el proceso de preparación de un compuesto estereoisoméricamente enriquecido de la fórmula I ó II y subfórmulas con el uso de un biocatalizador. El problema que sustenta esta invención es intentar proporcionar un proceso para la resolución enzimática de compuestos de las diferentes fórmulas en la forma éster (ver el Esquema 1 de la descripción detallada en el ejemplo 9-10). Las reivindicaciones 14 y 15 se relacionan con la resolución del compuesto "intermedio" II en formas estereoisoméricamente enriquecidas, de tal manera que pueda ser usado posteriormente para preparar compuestos producto que sean también estereoisoméricamente enriquecidos. (ver el Esquema 1, compuesto 3). La solución suministrada no requiere resolución enzimática sino el uso de una base quiral no racémica. La Regla 13 del PCT requiere, para que la unidad exista, que exista una relación técnica entre esos inventos que involucren uno o más de las mismas o correspondientes características especiales técnicas. Para una reivindicación de proceso para la preparación de compuestos (parcialmente) conocidos, la característica especial técnica debe ser los parámetros del proceso, y puesto que éstos no son los mismos entre las reivindicaciones 14 y 15 y las reivindicaciones 1-13, no están vinculados para formar un único concepto inventivo general, y consecuentemente, carece de unidad entre los dos grupos de inventos.

Ítem V

Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones soportando dicha declaración

Se hace referencia en esta comunicación a los siguientes documentos citados en el reporte de búsqueda;

- D1: PETERSEN, MICHAEL ET AL: "Biotechnology in the fine-chemicals industry. Cyclic amino acids by enantioselective biocatalysts" CHIMIA, 53(12), 608-612 CODEN: CHIMAD; ISSN: 0009-4293, 1999, XP001204977
D2: WO 02/100844 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC) 19 de diciembre de 2002
D3: WO 98/27222 A (LONZA AG; SAUTER, MARTIN; VENETZ, DANIEL; WERBITZKY, OLEG) 25 de junio de 1998
D4: WO 97/33987 A (LONZA AG; SAUTER, MARTIN; VENETZ, DANIEL; HENZEN, FABIENNE; SCHMIDHALT) 18 de septiembre de 1997

175

Con respecto al requerimiento de novedad (Artículo 33(2) del PCT), para la preparación de compuestos de la fórmula I (y IA y IB), D1 divulga en el esquema 1 una preparación que corresponde a la reivindicación 1 y 12 de la presente solicitud (ver "cepa *Aureobacterium* sp. como biocatalizador"). D2 divulga en la reivindicación 42 y en su descripción detallada compuestos de la fórmula general I, pero su preparación es realizada según la referencia en la página 170, la cual empieza a partir de reactivos quirales. D3 divulga un proceso general que corresponde a las reivindicaciones 1, 12 y 13 de la presente solicitud (ver las reivindicaciones, ejemplos y la página 18). D4 divulga un proceso similar, pero el cual no inicia a partir de ésteres. La reivindicación 9, la cual se relaciona con el proceso de preparación de los compuestos de la fórmula II parece ser novedosa con respecto a la fórmula V de D4 por el uso de un grupo éster. Por lo tanto, las reivindicaciones 1, 12 y 13 de la presente solicitud carecen de novedad con respecto a los antecedentes D1 y D3, puesto que las características de las reivindicaciones están todas divulgadas en estos documentos.

Con respecto al requerimiento de nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT), el problema que sustenta la presente solicitud parece haber sido el proveer un proceso para la preparación de compuestos de las fórmulas I y II en forma estereoisoméricamente enriquecida. La solución suministrada por la solicitud es la reacción del éster con un biocatalizador. Tal como el antecedente D1 explica específicamente tales transformaciones en el esquema 1 y de manera general en otros esquemas, al igual que D3 y D4 divulgan tales procesos, no es claro donde podría existir un nivel inventivo, puesto se sabe que puede obtenerse un buen valor ee (exceso enantiomérico). Adicionalmente, D1 implica que el papel del solvente es importante, y que ciertas acilasas no aceptan derivados sin un grupo carboxilo libre de tal manera que se pone en duda si el proceso de la reivindicación 1 podría ser capaz de proporcionar el enriquecimiento deseado en todos los casos. Por lo tanto, aún no queda satisfecho el artículo 33(3) del PCT para las reivindicaciones 1-13.

Ítem VI

Ciertos documentos citados

YAZBECK D R ET AL: "Retos en el desarrollo de un proceso enzimático eficiente en la industria farmacéutica" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 18, 20 de septiembre de 2004, páginas 2757-2763, XP004575045 ISSN: 0957-4166.

PATENT COOPERATION TREATY

~~Not recorded~~
RECEIVED
 DEC 12 2005
 MOPS IP GBL SRVS
 PCT

From the
 INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
 FULLER, GROVER, F., Jr.,
 Pfizer Inc
 201 Tabor Road
 Morris Plains, NJ 07850
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
 REPORT ON PATENTABILITY
 (PCT Rule 71.1)

Date of mailing
 (day/month/year) 06.12.2005

Applicant's or agent's file reference
 PC26187A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
 PCT/IB2004/003812

International filing date (day/month/year)
 22.11.2004

Priority date (day/month/year)
 04.12.2003

Applicant
 PFIZER INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/801).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International
 preliminary examining authority:



European Patent Office
 D-80298 Munich
 Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523856 epmu d
 Fax +49 89 2369 - 4465

Authorized Officer

Ambroa, J.R.
 Tel. +49 89 2369-8012



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC26187A	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/IB2004/003812	International filing date (day/month/year) 22.11.2004	Priority date (day/month/year) 04.12.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D207/16, C07D207/24, C07C271/22, C12P13/24		
Applicant PFIZER INC. et al.		
1. This report is the International preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the International application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the International application ☐ Box No. VIII Certain observations on the International application		
Date of submission of the demand 17.02.2005	Date of completion of this report 06.12.2005	
Name and mailing address of the International preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523856 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4485	Authorized Officer Scruton-Evans, I Telephone No. +49 89 2399-8272 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No. **PCT/IB2004/003812**

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-51 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
N PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2004/003812

179 12/1

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
- ☐ the entire international application,
 - ☒ claims Nos. 14,15
- because:
- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
 - ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
 - ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 14,15
 - ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
 - ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2004/003812

100
100

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has:
- ☐ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest.
 - ☒ neither restricted nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with.
 - ☐ not complied with for the following reasons:
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-13 .

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	1,12,13
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-13
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-13
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 14,15 were not searched (see box IV below) and thus no opinion will be given for these claims.

Re Item IV

Lack of unity of invention

Claims 1-13 are concerned with the process of preparation of a stereoisomerically enriched compound of the formula I or II and sub formulae by the use of a biocatalyst. The problem underlying this invention is the provision of a process for the enzymatic resolution of compounds of the various formulae in the ester form (see Scheme 1 of the description for an example 9-10). Claims 14 and 15 relate to the resolution of the "intermediate" compound II into stereoisomerically enriched forms, such that it may be further used to prepare product compounds which are themselves stereochemically enriched. (see Scheme 1, compound 3). The solution provided does not require enzymatic resolution, but rather the use of a chiral non-racemic base. Rule 13 of the PCT requires that for unity to be present, there must be a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. For a process claim for the preparation of (partly) known compounds, the special technical feature must be the process parameters, and as these are not the same for claims 14-15 as for claims 1-13, so they are not linked to form a single general inventive concept, and consequently unity is lacking between these two groups of inventions.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The following documents cited in the search report are referred to in this communication;

- D1: PETERSEN, MICHAEL ET AL: "Biotechnology in the fine-chemicals industry. Cyclic amino acids by enantioselective biocatalysis" CHIMIA , 53(12), 608-612 CODEN: CHIMAD; ISSN: 0009-4293, 1999, XP001204977**
- D2: WO 02/100844 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC) 19 December 2002 (2002-12-19)**
- D3: WO 98/27222 A (LONZA AG; SAUTER, MARTIN; VENETZ, DANIEL; WERBITZKY, OLEG) 25 June 1998 (1998-06-25)**
- D4: WO 97/33987 A (LONZA AG; SAUTER, MARTIN; VENETZ, DANIEL; HENZEN, FABIENNE; SCHMIDHALT) 18 September 1997 (1997-09-18)**

With regard to the requirement for novelty (Article 33(2) of the PCT), for the preparation of compounds of formula I (and IA and IB), D1 discloses in scheme 1 a preparation which falls under claim 1 and 12 of the present application (see "Aureobacterium sp. strain as the biocatalyst"). D2 discloses in claim 42 and in the description compounds of the general formula I, but their preparation is made according to the reference on page 170, which starts from chiral reactants. D3 discloses a general process which falls under claims 1, 12 and 13 of the present application (see claims, examples and page 18). D4 discloses a similar process, but not starting from the esters. Claim 9, directed to the process of preparation of the compounds of formula II appears to be novel with respect to formula V of D4 on account of the use of an ester group. Thus the present application claims 1, 12, 13 lack novelty with respect to D1 and D3, in that the features of the claims are all disclosed in these documents.

With regard to the requirement for inventive step (Article 33(3) of the PCT), the problem underlying the present application appears to have been the provision of a process for the preparation of compounds of the formulae I and II in stereoisomerically enriched form. The solution provided by the application is the reaction of the ester with a biocatalyst. As D1 discusses specifically in scheme 1 and generally in other schemes such transformations, and D3 and D4 also disclose such processes, it is not clear wherein an inventive step could lie, as it is known that a good ee can be obtained. Furthermore, D1 implies that the role of the solvent is important, and that certain acylases do not accept derivatives without a free carboxy group, such that it is queried whether the process as described in claim 1 would be able to provide the desired enrichment in all cases. Article 33(3) of the PCT is thus not yet satisfied for claims 1-13.

3
23

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2004/003812

Re Item VI

Certain documents cited

YAZBECK D R ET AL: "Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 18, 20 September 2004 (2004-09-20), pages 2757-2763, XP004575045 ISSN: 0957-4166

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC26187A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/IB2004/003812	International filing date (day/month/year) 22/11/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 04/12/2003
Applicant PFIZER INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/003812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D207/16 C07D207/24 C07C271/22 C12P13/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D C07C C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PETERSEN, MICHAEL ET AL: "Biotechnology in the fine-chemicals industry. Cyclic amino acids by enantioselective biocatalysis" CHIMIA, 53(12), 608-612 CODEN: CHIMAD; ISSN: 0009-4293, 1999, XP001204977 see scheme 1, and pages 609-610	1,12
Y	----- see scheme 1, and pages 609-610	1-13
A	WO 02/100844 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC) 19 December 2002 (2002-12-19) cited in the application see claim 42, page 61, example 109A, general method A, page 82, page 170 ----- -/--	22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 2005

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 6018 Patentamt 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-6040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scruton-Evans, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/003812

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	YAZBECK D R ET AL: "Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 18, 20 September 2004 (2004-09-20), pages 2757-2763, XP004575045 ISSN: 0957-4166 the whole document	1-13
X	----- WO 98/27222 A (LONZA AG; SAUTER, MARTIN; VENETZ, DANIEL; WERBITZKY, OLEG) 25 June 1998 (1998-06-25)	1,12,13
Y	see claims, examples and page 18	1-13
Y	----- WO 97/33987 A (LONZA AG; SAUTER, MARTIN; VENETZ, DANIEL; HENZEN, FABIENNE; SCHMIDHALT) 18 September 1997 (1997-09-18) see formula I, examples and claims, and formulae V,Vi and VII	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2004/003812

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-13

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 219

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-13

Process for the preparation of stereoisomerically enriched compounds of formula I, IA, IB, II and IIA by treatment of the compound wherein R6 is not H with biocatalyst.

2. claims: 14-15

Resolution of a compound of the formula II

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2004/003812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02100844 A	19-12-2002	AU 2002316235 A2	23-12-2002
		BR 0210344 A	13-07-2004
		BR 0210358 A	22-06-2004
		CA 2450265 A1	19-12-2002
		CA 2450269 A1	19-12-2002
		EP 1448539 A1	25-08-2004
		EP 1409466 A2	21-04-2004
		JP 2004534061 T	11-11-2004
		WO 02100845 A1	19-12-2002
		WO 02100844 A2	19-12-2002
		US 2003153507 A1	14-08-2003
		US 2003225071 A1	04-12-2003
		US 2004171842 A1	02-09-2004
		US 2004204591 A1	14-10-2004
		ZA 200309041 A	22-07-2004
WO 9827222 A	25-06-1998	AU 5757498 A	15-07-1998
		CA 2274896 A1	25-06-1998
		CZ 9902131 A3	17-11-1999
		WO 9827222 A1	25-06-1998
		EP 0944730 A1	29-09-1999
		JP 2001506500 T	22-05-2001
WO 9733987 A	18-09-1997	AU 2155797 A	01-10-1997
		CA 2245543 A1	18-09-1997
		CN 1213400 A	07-04-1999
		CZ 9802811 A3	16-12-1998
		WO 9733987 A1	18-09-1997
		EP 0896617 A1	17-02-1999
		JP 2000506728 T	06-06-2000
		NO 984206 A	11-09-1998
		PL 328795 A1	15-02-1999
		SK 117198 A3	10-03-1999
		US 2002037559 A1	28-03-2002

190

**Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones**

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL
TRAMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION () MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Descripción de la invención.	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 191

2020

Bogotá D.C.,

Doctor(a)

OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO

Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	06 52852
	Solicitud internacional	IB2004/003812
	Fecha inicio fase nacional	04/07/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	1273
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC,

13 JUL 2006

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpall