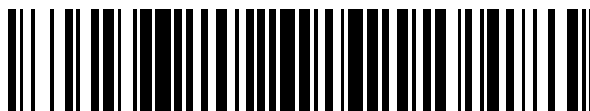


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 246**

51 Int. Cl.:

**C07C 303/22** (2006.01)

**C07C 319/24** (2006.01)

**C07C 323/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2011 PCT/EP2011/067524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12045849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2011 E 11769843 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2625163**

54 Título: **Método para la preparación de (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico)**

30 Prioridad:

**07.10.2010 EP 10306099**

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

**12.11.2018**

73 Titular/es:

**QUANTUM GENOMICS (100.0%)  
Tour Montparnasse, 33 Avenue du Maine  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BALAVOINE, FABRICE;  
MADEC, JONATHAN;  
SCHNEIDER, JEAN-MARIE;  
COQUEREL, GÉRARD;  
COUV RAT, NICOLAS;  
CARTIGNY, YOHANN y  
PETIT, MARIE-NOËLLE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 689 246 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico)

La presente invención se refiere a un nuevo método para la preparación de (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico) en cinco etapas a partir de (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo **A**. El (3S,3S')-4,4'-disulfandiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico) se denomina "Compuesto I" en la presente invención.

El Compuesto I es un dímero del inhibidor selectivo de aminopeptidasa **A** (APA) ácido 3-amino-4-mercaptobutansulfónico (también denominado **EC33** en documentos anteriores), generado creando un enlace disulfuro entre los extremos tiol de dos moléculas de ácido 3-amino-4-mercaptobutansulfónico. La dimerización proporciona una molécula más susceptible de cruzar la barrera sangre-cerebro en forma de un profármaco. Se ha demostrado que el Compuesto I (también denominado **RB150** en documentos anteriores) es un agente antihipertensor eficiente, como se describe por Bodineau et al. en Hypertension 2008 51, 1318-1325.

El compuesto I y su uso como antihipertensor se describieron en la solicitud de patente WO2004/007441. El ejemplo del procedimiento proporcionado en este documento para sintetizar el compuesto I permite su formación, en 6 etapas, a partir de L-homoserina. Las especificaciones técnicas, particularmente los números de equivalentes, disolventes y/o técnicas de purificación implicadas en este procedimiento, no permiten que se convierta de manera eficiente y fácil a escala industrial.

Un objetivo permanente en la síntesis orgánica es crear procedimientos de síntesis que se puedan trasladar a condiciones industriales. Para cumplir con los requisitos de los procedimientos industriales, se deben optimizar los diferentes parámetros de la síntesis. En primer lugar, los disolventes deben ser tan poco volátiles como sea posible para que sean fácilmente recuperables. De este modo, los disolventes volátiles clorados, por ejemplo, diclorometano, cloroformo y/o tetracloruro de carbono se evitan preferentemente. Además, los números de equivalentes de los reactivos requeridos son preferentemente limitados, las temperaturas implicadas preferentemente permanecen en un intervalo fácilmente accesible, y se deben favorecer las etapas de purificación fáciles de realizar. Finalmente, las mezclas de reacción y el producto aislado son preferentemente térmicamente estables.

Las Buenas Prácticas de Fabricación actuales (c-GMP) se han definido para la preparación de productos farmacéuticos para administración a seres humanos o animales. Las regulaciones GMP requieren un enfoque de calidad para la fabricación, permitiendo a las compañías minimizar o eliminar casos de contaminación, confusiones y errores. Las reglamentaciones de GMP abordan cuestiones que incluyen el mantenimiento de registros, las calificaciones del personal, el saneamiento, la limpieza, la verificación del equipo, la validación del procedimiento y la tramitación de reclamaciones.

Según el conocimiento del solicitante, hasta ahora no se ha descrito ningún procedimiento industrialmente aplicable para sintetizar el compuesto I.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar el compuesto I que se pueda adaptar fácil y eficientemente a escala industrial, en comparación con el procedimiento de la técnica anterior, en el que se usan disolventes tóxicos, tales como dimetilformamida y cromatografía en columna.

Además, dado que generalmente se requiere una forma altamente pura, típicamente superior al 99,5 por ciento, de cualquier fármaco para el tratamiento humano, es particularmente ventajoso un método que combine el control de la formación de isómeros y una purificación final fácil.

## Método

La presente invención se refiere a un nuevo método para la preparación del compuesto I, más particularmente en 5 etapas, a partir de (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo **A**. El esquema 1 ilustra las etapas sucesivas que conducen de **A** al compuesto I.

A menos que se indique lo contrario, las siguientes abreviaturas y denominaciones se usan a lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente invención:

Et = etilo; tBu = terc-butilo; CH<sub>2</sub>-tBu = neopentilo = 2,2-dimetilpropilo

Cbz = Carbobenciloxi

Ms = mesilo = SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

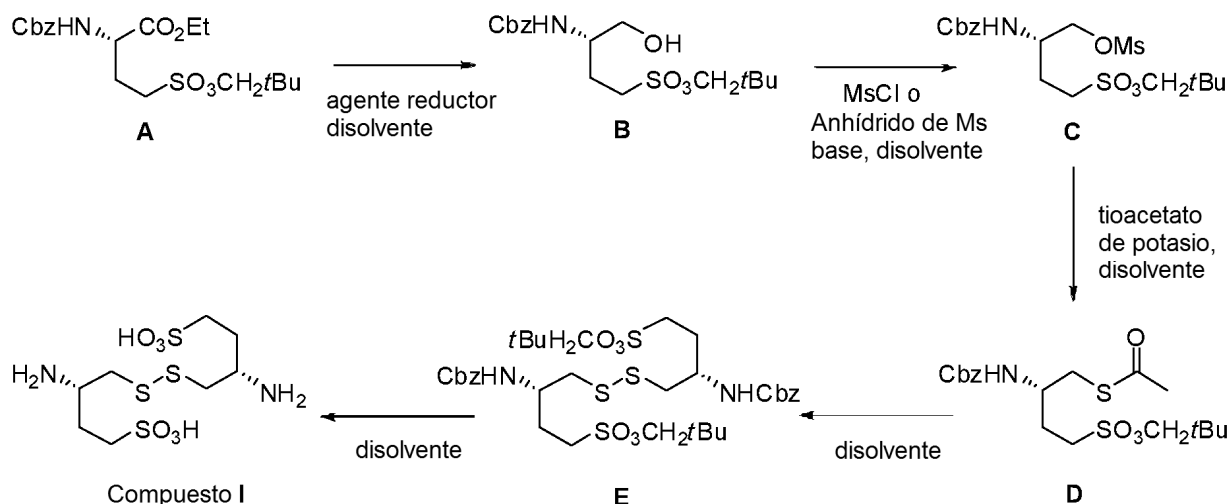
MTBE = metil-(terc-butil)-éter

HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución

ee = exceso enantiomérico

- 5 Cada reacción descrita aquí se puede realizar en fase sólida o en fase líquida. Las reacciones en fase líquida se pueden realizar preferentemente en un disolvente seleccionado de disolventes orgánicos o acuosos, por ejemplo THF, etanol, cloroformo, MTBE, tolueno, acetona, TFA y/o anisol.

Esquema 1:



- 10 El primer objetivo de la presente invención se refiere a un método general para la preparación del compuesto **I** a partir de **A**, que comprende las siguientes etapas:

- (a) reducir el éster etílico de **A**, para dar (S)-3-(benciloxycarbonilamino)-4-hidroxitbutano-1-sulfonato de neopentilo **B**;
- (b) hacer reaccionar el alcohol **B** con anhídrido metanosulfónico o cloruro de metanosulfonilo en presencia de una base, para dar (S)-3-(benciloxycarbonilamino)-4-(metilsulfonilo)butano-1-sulfonato de neopentilo **C**;
- 15 (c) hacer reaccionar el alcohol **C** mesilado con tioacetato de potasio, para dar tioacetato de (S)-2-(benciloxycarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butilo **D**;
- (d) dimerizar **D** para dar (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(3-(benciloxycarbonilamino)butano-1-sulfonato) de neopentilo **E**; y
- (e) desproteger los grupos éster sulfónico y amina de **E**, para dar el compuesto (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico) **I**.

- 20 El método descrito anteriormente se denomina "el método general" en la presente descripción.

Preferentemente, la etapa (a) se puede realizar haciendo reaccionar **A** con un par agente reductor-disolvente seleccionado de  $\text{NaBH}_4/\text{LiCl}$  - mezcla de THF y etanol, preferentemente en una relación en volumen de 1:1, y  $\text{LiBH}_4$ -THF, más preferentemente  $\text{LiBH}_4$ -THF. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de  $0^\circ\text{C}$  a alrededor de  $25^\circ\text{C}$ , preferentemente de alrededor de  $20^\circ\text{C}$  a alrededor de  $25^\circ\text{C}$ .

- 25 Más preferentemente, la etapa (a) se puede realizar haciendo reaccionar **A** con  $\text{LiBH}_4$  - THF, a una temperatura de alrededor de  $20^\circ\text{C}$  a alrededor de  $25^\circ\text{C}$ .

El uso de  $\text{LiBH}_4$ , que es soluble y estable en THF, representa una mejora de seguridad innegable; en particular, permite el uso de THF puro como disolvente y, por consiguiente, evita la liberación de hidrógeno gaseoso debido a la descomposición del borohidruro de sodio en etanol.

- 30 Preferentemente, la etapa (b) se puede realizar en presencia de trietilamina. La reacción se puede realizar en un disolvente seleccionado de cloroformo y una mezcla de MTBE y tolueno, preferentemente una mezcla de MTBE y tolueno, preferentemente en una relación en volumen de 3:2. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de  $-10^\circ\text{C}$  a alrededor de  $10^\circ\text{C}$ , preferentemente de alrededor de  $5^\circ\text{C}$  a alrededor de  $10^\circ\text{C}$ .

La transposición industrial de una síntesis requiere que los disolventes volátiles se reemplacen preferentemente por disolventes menos volátiles y/o más fáciles de recuperar. Las condiciones más preferidas para la etapa (b) en esta invención incluyen la sustitución de cloroformo por un disolvente menos volátil y/o más fácil de recuperar, tal como una mezcla de MTBE y tolueno con una relación en volumen de 3:2.

5 Más preferentemente, la etapa (b) se puede realizar en presencia de trietilamina en una mezcla de MTBE y tolueno con una relación en volumen de 3:2, a una temperatura de alrededor de 5°C a alrededor de 10°C.

Preferentemente, la etapa (c) se puede realizar en un disolvente seleccionado de etanol y acetona, preferentemente acetona. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C.

10 Más preferentemente, la etapa (c) se puede realizar en acetona, a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C.

Preferentemente, la etapa (d) se puede realizar poniendo primero en contacto **D** con hidróxido de sodio. La mezcla obtenida se puede hacer reaccionar a continuación con yodo. El disolvente puede ser etanol. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C.

15 La etapa (e) se puede realizar agitando **E** en una mezcla a reflujo de TFA y anisol, preferentemente con una relación en volumen de 5:1.

Una forma más preferida de la presente invención es el método general descrito anteriormente, en el que:

- la etapa (a) se realiza haciendo reaccionar **A** con  $\text{LiBH}_4$  - THF, a una temperatura de alrededor de 20°C a alrededor de 25°C;

20 - la etapa (b) se realiza en presencia de trietilamina, en una mezcla de MTBE y tolueno con una relación en volumen de 3:2, a una temperatura de alrededor de 5°C a alrededor de 10°C;

- la etapa (c) se realiza en acetona, a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C;

- la etapa (d) se realiza poniendo en contacto primero **D** con hidróxido de sodio, en etanol, a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C y a continuación haciendo reaccionar la mezcla obtenida con yodo, en etanol, a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C; y

25 - la etapa (e) se realiza agitando **E** en una mezcla a reflujo de TFA y anisol con una relación en volumen de 5:1.

Este método comprende las etapas optimizadas de (a) a (e) para aplicación industrial, en particular las etapas de (b) a (e) incluso cumplen con los requisitos de c-GMP.

30 La transposición industrial de una síntesis requiere la optimización de los parámetros. En particular, se evitan preferentemente las reacciones de entalpía alta. Se prefieren altos niveles de pureza para los productos. Los productos aislados son preferentemente térmicamente estables.

La Tabla 1 proporciona las entalpías de reacción, las purezas (determinadas por HPLC y expresadas en forma de porcentajes en moles) y las estabilidades de los productos de cada etapa para este método preferido.

Tabla 1.

	Pureza	Entalpias	Estabilidad
Etapa (a)	94,0% ee 98%	$\Delta rH_{\text{(adición sobre LiBH}_4\text{)}} = -235 \text{ kJ/mol}$ $\Delta rH_{\text{(hidrólisis con HCL)}} = -145 \text{ kJ/mol}$	Fusión a 53°C
Etapa (b)	98%	$\Delta rH = -253 \text{ kJ/mol}$	Fusión a 66°C Descomposición a 103°C
Etapa (c)	98%	$\Delta rH = -145 \text{ kJ/mol}$	Fusión a 72°C Descomposición a 154°C
Etapa (d)	97%	$\Delta rH_{\text{(adición de NaOH)}} = -49 \text{ kJ/mol}$ $\Delta rH_{\text{(adición de I}_2\text{)}} = -136 \text{ kJ/mol}$	Fusión a 100°C Descomposición a 140°C
Etapa (e)	>99,9%	$\Delta rH = -389 \text{ kJ/mol}$	Fusión a 78°C No se observó descomposición

5 La transposición industrial de una síntesis requiere que se prefieran etapas de purificación fáciles, especialmente la última etapa de purificación de la síntesis.

Una forma preferida de esta invención se refiere al procedimiento de síntesis del compuesto I como se describió previamente, en el que la purificación del compuesto I se realiza por recristalización en agua.

La transposición industrial de una síntesis requiere que se prefieran las formas más estables de compuestos, especialmente la forma más estable del producto final.

10 Los estudios realizados en el compuesto I mostraron que las formas de hidrato, particularmente la forma de trihidrato, son más estables que la forma pura del compuesto. La forma trihidrato del compuesto I, (3H<sub>2</sub>O) es la forma más estable en condiciones ambientales. Cualquier mezcla de hidratos del compuesto I evolucionará en pocos días hacia la forma de trihidrato en condiciones ambientales. Las condiciones ambientales como se usan aquí se refieren a una temperatura entre 15°C y 25°C, a presión atmosférica, y a un porcentaje de humedad relativa superior al 50%.

15 Una forma preferida de esta invención se refiere al procedimiento de síntesis del compuesto I como se describe previamente, en el que el compuesto I se obtiene como una forma de hidrato, preferentemente como la forma de trihidrato.

20 Se describe la forma cristalina de trihidrato del compuesto I. En particular, la estructura cristalográfica del compuesto I trihidrato se detalla en el ejemplo 2.

La síntesis del material de partida del método general descrito anteriormente, el (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo **A**, se ha descrito ya en la solicitud de patente WO2004/007441, como un intermedio en la síntesis de 4,4'-tiobis(3-aminobutano-1-neopentilsulfonato)bis-trifluoroacetato. El aislamiento del mismo se puede realizar fácilmente por una persona de experiencia media en la técnica, si es necesario.

25 La síntesis del compuesto **A** a partir de L-homocistina comprende las siguientes etapas:

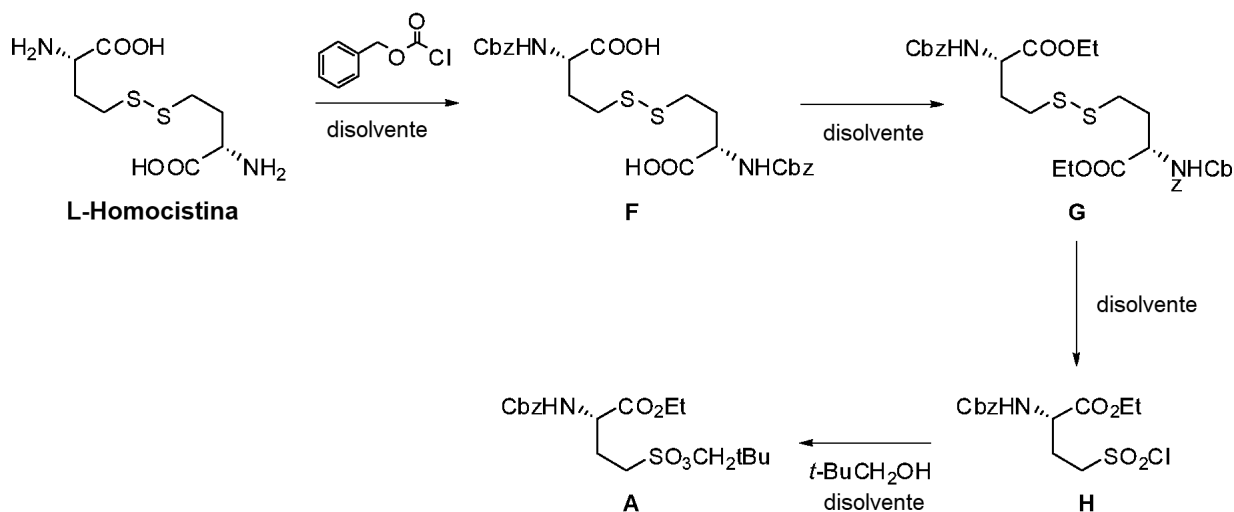
(a-1) hacer reaccionar L-homocistina con cloroformiato de bencilo para dar ácido (2S,2S')-4,4'-disulfanodiilbis(2-(benciloxicarbonilamino)butanoico) **F**;

(b-1) llevar a cabo una reacción de esterificación entre **F** y etanol para dar (2S,2S')-4,4'-disulfanodiilbis(2-(benciloxicarbonilamino)butanoato) de dietilo **G**;

30 (c-1) escisión oxidativa del enlace disulfuro de **G** para dar (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(clorosulfonil)butanoato de etilo **H**; y

(d-1) hacer reaccionar el cloruro de sulfonilo **H** con alcohol neopentílico para dar (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo. La síntesis de **A** a partir de L-homocistina se ilustra en el Esquema 2.

Esquema 2:



Con las mismas preocupaciones que las evocadas para la síntesis del compuesto **I** a partir de **A**, el procedimiento para sintetizar **A** se puede optimizar para hacerlo tanto como sea posible de acuerdo con los requisitos industriales.

- 5 Preferentemente, la etapa (a-1) se puede realizar en presencia de hidróxido de sodio. El disolvente puede ser THF. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de 5°C a alrededor de 25°C, preferentemente la temperatura puede permanecer entre alrededor de 5°C y alrededor de 10°C durante la adición de reactivos.

10 La facilidad de análisis es un criterio importante para que una síntesis sea apropiada para la industria. La presencia de grupos protectores de amina Cbz en el compuesto **F** puede hacerlo más apropiado para el análisis, particularmente para el análisis por HPLC.

Preferentemente, la etapa (b-1) se puede realizar haciendo reaccionar **F** con cloruro de tionilo. El disolvente puede ser etanol puro. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de 45°C a alrededor de 55°C.

Preferentemente, la etapa (c-1) se puede realizar haciendo reaccionar **G** con cloro. El disolvente puede ser etanol. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de 5°C a alrededor de 10°C.

- 15 Preferentemente, la etapa (d-1) se puede realizar en presencia de trietilamina. El disolvente puede ser tolueno. La reacción se puede realizar a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1:

20 Diagramas de XRPD (Difracción de rayos X de polvo) comparados del compuesto **I** trihidrato: calculado a partir de una estructura de un solo cristal (espectro inferior) y experimental (espectro superior).

Figura 2:

Representación de ORTEP (gráfico de elipsoide térmico de Oak Ridge) del compuesto **I** trihidrato.

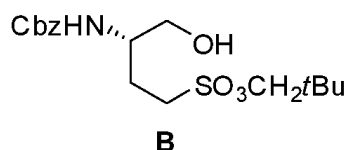
Figura 3:

25 Proyección a lo largo de un eje del compuesto **I** trihidrato. Los enlaces de H están representados por líneas discontinuas.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis del compuesto **I** a partir de (S)-2-(benciloxycarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo **A**.

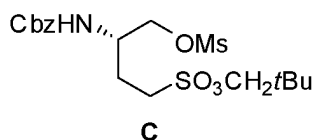
Etapa (a): (S)-3-(benciloxycarbonilamino)-4-hidroxitbutano-1-sulfonato de neopentilo **B**



5 Se añade (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo (41,55 g, 100,0 mmol, 1,0 eq.) gota a gota a una disolución 2M de LiBH<sub>4</sub> en THF (50 ml, 44,8 g, 100,0 mmol, 1,0 eq.). La adición se realiza a temperatura ambiente durante un período de 3 horas. Al final de la adición, la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se completa la conversión (A <1%). La adición de tolueno, seguida de hidrólisis con HCl, lavados de la capa orgánica con NaHCO<sub>3</sub> y agua, y la concentración al vacío conducen al producto deseado en forma de un aceite amarillo pálido con rendimiento cuantitativo (ee = 98%), que cristaliza lentamente a temperatura ambiente en 4 o 5 días.

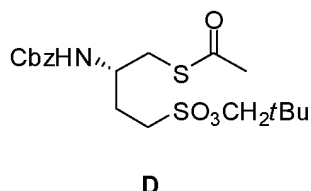
10 Como se encontró que **B** tenía un punto de fusión muy bajo por análisis de DSC, no fue posible aislarlo en forma de un sólido por simple cristalización. Se decidió dejarlo en disolución y usarlo sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Etapa (b): (S)-3-(benciloxicarbonilamino)-4-(metilsulfoniloxi)butano-1-sulfonato de neopentilo **C**.



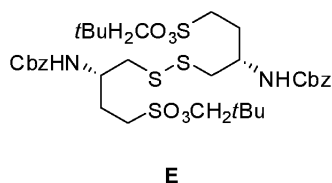
15 Una disolución de **B** (57,64 g, 154,34 mmol, 1,0 eq.) en tolueno (115 ml, 2,0 vol.) se diluye con MTBE (173 ml, 3,0 vol.) a temperatura ambiente. A continuación se añade cloruro de mesilo (17,9 ml, 26,5 g, 231,50 mmol, 1,5 eq.) a temperatura ambiente y la mezcla homogénea se enfría a 10°C. La adición de trietilamina (43,0 ml, 31,2 g, 308,67 mmol, 2,0 eq.) se realiza a T <20°C. Al final de la adición, la mezcla se agita a 10°C hasta que se completa la conversión (B <1%). Después de la hidrólisis con HCl diluido, la capa orgánica se lava con NaHCO<sub>3</sub>, agua y salmuera, seguido de una concentración parcial a presión reducida. El mesilato correspondiente se cristaliza después por adición de heptanos (5,0 vol.) a 40°C. Después de enfriar, filtrar y secar, el producto esperado se aísla en forma de un sólido blanquecino con un rendimiento del 92,5% y con una pureza química muy alta (98%).

Etapa (c): tioacetato de (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butilo **D**



25 Se añade una disolución de mesilato **C** (81,3 g, 180,05 mmol, 1,0 eq.) en acetona (203 ml, 2,5 vol.) gota a gota a una suspensión de tioacetato de potasio (41,1 g, 360,1 mmol, 2,0 eq.) en acetona (203 ml, 2,5 vol.) a temperatura ambiente y durante un período de 2 horas. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente hasta que se completa la conversión (C <1%). Después de la filtración de las sales y la adición de tolueno (4,0 vol.), la acetona se retira por destilación a presión reducida a 25°C. La disolución a continuación se trata con carbón activo y se concentra a 2,0 volúmenes. La adición lenta de heptano (5,0 vol.) a temperatura ambiente, seguido de enfriamiento a 0°C, filtración y secado a 45°C, proporciona el producto esperado en forma de un sólido blanquecino con un 78,2% de rendimiento y con una pureza química muy alta (98%).

Etapa (d): (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(3-(benciloxicarbonilamino)butano-1-sulfonato) de neopentilo **E**



35 Una disolución de **D** (59,16 g, 137,1 mmol, 1,0 eq.) suspendida en etanol (203 ml, 2,5 vol.) se enfría a 0°C. A continuación, se añade hidróxido de sodio al 20% (25,1 ml, 150,8 mmol, 1,1 eq.) diluido con agua (16,9 ml, 0,285 vol.) gota a gota a la suspensión manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. La mezcla de reacción se calienta

- 5 a temperatura ambiente y se agita hasta que se completa la conversión ( $D < 1\%$ ). El tiol intermedio reacciona a temperatura ambiente con una disolución de yodo (20,9 g, 82,3 mmol, 0,6 eq.) en etanol (118 ml, 2,0 vol.). La reacción se completa al final de la adición del agente oxidante. Después de la adición de una disolución acuosa (118 ml, 2,0 vol.) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (13,0 g, 68,5 mmol, 0,5 eq.) para reducir el exceso de yodo residual, el etanol se retira por destilación a presión reducida a  $40^\circ\text{C}$ . La adición de agua (3,0 vol.) a temperatura ambiente, seguido de enfriamiento a  $0^\circ\text{C}$ , filtración y secado a  $45\text{-}50^\circ\text{C}$ , proporciona el dímero esperado en forma de un sólido blanco con 98,3% de rendimiento y con una pureza química muy alta (97,0%).

La cantidad de iones yoduro, proveniente de la reducción de yodo, se verifica en la muestra mediante un ensayo potenciométrico.

- 10  $E^\circ (\text{Ag}^+ / \text{Ag} (\text{s})) = 0,80\text{V}$

$$K_{\text{S}_{\text{AgI}}} = 1,5 \cdot 10^{-16}$$

$$[\text{AgNO}_3] = 0,1\text{N}$$

$$\text{Electrodo: } E = E^\circ (\text{Ag}^+ / \text{Ag} (\text{s})) + 0,06 \log [\text{Ag}^+]$$

$$[\text{Ag}^+] = K_{\text{Si}} / [\text{I}^-]$$

- 15  $E = E^\circ (\text{Ag}^+ / \text{Ag} (\text{s})) + 0,06 \log (K_{\text{Si}} / [\text{I}^-])$

Ensayo:  $[\text{I}^-]$  disminuye y  $E$  aumenta

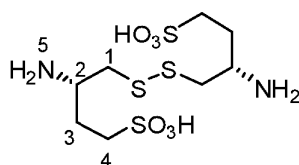
$$\text{LOD} = 1 \text{ mg}$$

Se realizan cuatro lavados adicionales con agua hasta que no se detectan más iones yoduro. Los resultados se presentan en la tabla 2.

- 20 Tabla 2.

Lavados	1	2	3	4
Ensayo de $\text{I}^-$ (%)	4,5	1,26	0,12	0,02

Etapa (e): compuesto I (3S,3S')-4,4'-disulfanodilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico)



Compuesto I

- 25 Una disolución de **E** (44,0 g, 56,6 mmol, 1,0 eq.) en TFA (220 ml, 5,0 vol.) y anisol (44 ml, 1,0 vol.) se calienta a reflujo ( $75^\circ\text{C}$ ) y la mezcla de reacción se agita en estas condiciones hasta que se completa la conversión ( $E < 1\%$ ). El TFA se retira por destilación a presión reducida a  $50^\circ\text{C}$ . La adición lenta de MTBE (5,0 vol.) a temperatura ambiente hace que el producto esperado precipite. Después de trituración, filtración y lavado con MTBE (1,0 vol.), el sólido en bruto se suspende en metanol (220 ml, 5,0 vol.). Una nueva trituración, filtración y lavado con MTBE (1,0 vol.),
- 30 seguido de secado a presión reducida, proporciona el compuesto **I** en forma de un sólido blanco con un rendimiento del 92,5%.

RMN:  $^1\text{H}$  (disolvente  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz, ppm): 4,70 (s, 6H,  $\text{H}_5$ ); 3,77 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ); 3,14 (dd, 2H,  $\text{H}_1$ ); 2,98 (dd, 4H,  $\text{H}_4$ ); 2,86 (dd, 2H,  $\text{H}_1$ ); 2,13 (m, 4H,  $\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  (disolvente  $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz, ppm): 49,4 (2C,  $\text{C}_2$ ); 46,6 (2C,  $\text{C}_4$ ); 38,3 (2C,  $\text{C}_1$ ); 26,9 (2C,  $\text{C}_3$ ).

- 35 Ejemplo 2: datos cristalográficos del compuesto **I** trihidrato

El compuesto **I** obtenido en el ejemplo 1 se almacenó durante 22 días en condiciones ambientales para que contuviera exclusivamente la forma de trihidrato.

Recogida de datos:

La estructura cristalina del compuesto **I** trihidrato [ $\text{C}_8\text{S}_4\text{N}_2\text{O}_6\text{H}_2\text{O}$ ,  $3(\text{H}_2\text{O})$ ], se ha determinado por difracción de rayos



X (XRD) de un solo cristal. El cristal elegido se pegó en una fibra de vidrio y se montó en el goniómetro de tres círculos completo de un difractor Bruker SMART APEX con un detector de área CCD. Se registraron tres conjuntos de exposiciones (un total de 1.800 fotografías), correspondientes a tres barridos  $\omega$  (etapas de  $0,3^\circ$ ), para tres valores diferentes de  $\varphi$ .

5 La Figura 1 muestra patrones de XRD experimentales y calculados del compuesto I trihidrato.

La Tabla 3 presenta una selección de reflexiones calculadas de PowderCell para la estructura del compuesto I trihidrato y las correspondientes posiciones e intensidades de los picos experimentales. No se debe conferir demasiada importancia a los valores de intensidad de los picos experimentales dado que los efectos de orientación preferencial que dependen del procedimiento de cristalización son muy importantes.

10 Tabla 3.

h	k	l	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d (Å)	I (%)	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d (Å)	I (%)
Calculado						Experimental		
0	0	1	5,08	17,39	14	5,09	17,34	76
0	1	2	14,27	6,20	23	14,30	6,19	23
0	0	3	15,28	5,79	7	15,30	5,79	100
-1	0	2	17,60	5,03	13	17,62	5,03	15
0	1	3	18,28	4,85	55	18,32	4,84	96
1	0	2	18,59	4,77	40	18,61	4,76	30
1	1	1	18,95	4,68	28	18,98	4,67	16
-1	1	2	20,27	4,38	47	20,34	4,36	26
0	2	1	20,70	4,29	37	20,75	4,28	26
1	1	2	21,15	4,20	14	21,16	4,19	11
1	0	3	22,05	4,03	27	22,09	4,02	37
0	1	4	22,77	3,90	12	22,79	3,90	37
-1	1	3	23,11	3,85	3	23,12	3,84	6
-1	0	4	24,66	3,61	47	24,65	3,61	74
1	2	0	25,10	3,54	13	25,15	3,54	7
0	0	5	25,60	3,48	4	25,60	3,48	62
1	2	1	25,80	3,45	100	25,83	3,45	39
-1	1	4	26,67	3,34	5	26,66	3,34	7
0	1	5	27,54	3,24	2	27,52	3,24	13
1	1	4	28,01	3,18	1	28,05	3,18	4
-1	0	5	28,98	3,08	1	28,94	3,08	4

15 Los parámetros de celda y la matriz de orientación del cristal se determinaron antes mediante el uso de software SMART. La integración de datos y el refinamiento de la celda global se realizaron con el software SAINT. Las intensidades se corrigieron para Lorentz, polarización, decaimiento y efectos de absorción (softwares SAINT y SADABS) y se redujeron a  $F_0^2$ . El paquete de programas WinGX3 se usó para la determinación de grupos espaciales, la resolución de estructuras y el refinamiento.

Refinamiento de datos:

20 El grupo espacial estándar  $P2_1$  ( $n^\circ 4$ ) se determinó a partir de extinciones sistemáticas y  $F_0^2$  relativa de reflexiones equivalentes. La estructura se resolvió por métodos directos (SIR 92). Los parámetros de desplazamiento anisotrópico se refinaron para todos los átomos que no son de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno se localizaron a partir de la subsecuente síntesis de Fourier de diferencia y se colocaron con restricciones geométricas (SHELXL). El ciclo final de refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F2 se basó en 3.714 reflexiones observadas y 234 parámetros variables y convergió con factores de acuerdo ponderados y no ponderados de:

$R1 = 0,0347$ ,  $wR2 = 0,0845$  para  $[F^2 > 2\sigma(F^2)]$  y  $R1 = 0,0371$ ,  $wR2 = 0,0934$  para todos los datos.

25 Los cristales se obtuvieron por evaporación lenta de una disolución saturada de compuesto I en agua a temperatura ambiente.

Datos cristalográficos:

Tabla 4.

Fórmula química	$C_8S_4N_2O_6H_{20}, 3(H_2O)$
Peso molecular /g . mol <sup>-1</sup>	422,55
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> (nº 4)
Z	2
Z' (unidades asimétricas por celda unidad)	1
a / Å	5,936(2)
b / Å	8,849(3)
c / Å	17,416(7)
β (°)	93,349(6)
V / Å <sup>3</sup>	913,4(6)
d calculada / g.cm <sup>-3</sup>	1,536
Temperatura / K	293(2)
Parámetro de estructura absoluto	0,0(5)
Color del cristal	Incoloro
Tamaño aproximado del cristal / mm	0,5 x 0,3 x 0,05
F(000) / e <sup>-</sup>	448
Coefficiente de absorción μ (MoKα1) /mm <sup>-1</sup>	0,562

- 5 La Tabla 5 presenta las coordenadas atómicas ( $\times 10^4$ ) y los parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ( $\text{Å}^2 \times 10^3$ ). U (eq) se define como un tercio de la traza del tensor  $U_{ij}$  ortogonalizado.

Tabla 5

	x	y	z	U (eq)
S (1)	-6907 (8)	11820 (6)	2086 (3)	36 (1)
S (2)	-120 (8)	6540 (6)	3958 (3)	29 (1)
S (1A)	-5005 (10)	13527 (7)	2563 (3)	36 (1)
S (2A)	1135 (8)	14087 (6)	-658 (3)	28 (1)
O (1)	1610 (20)	7004 (18)	3451 (9)	39 (4)
O (2)	-1390 (30)	5256 (19)	3657 (11)	46 (4)
O (3)	800 (30)	6300 (20)	4737 (9)	52 (5)
O (1A)	2310 (30)	12720 (20)	-396 (12)	53 (5)
O (2A)	2380 (30)	15414 (19)	-407 (9)	39 (4)
O (3A)	510 (30)	14090 (30)	-1476 (9)	53 (5)
N (1)	-6330 (30)	9880 (20)	3645 (10)	31 (4)
N (1A)	-4670 (30)	15277 (19)	942 (9)	28 (4)
C (1)	-5210 (40)	10160 (30)	2306 (12)	35 (5)
C (2)	-4410 (30)	9920 (20)	3132 (11)	28 (4)
C (3)	-3070 (40)	8440 (30)	3193 (12)	35 (5)
C (4)	-2020 (40)	8090 (20)	3988 (12)	31 (4)
C (1A)	-2670 (40)	13690 (30)	1940 (12)	35 (5)
C (2A)	-3260 (30)	13880 (20)	1091 (11)	27 (4)
C (3A)	-1 110 (30)	13990 (30)	661 (11)	29 (4)
C (4A)	-1460 (30)	14090 (30)	-199 (11)	31 (4)
OWA	2000 (30)	6520 (20)	1873 (11)	51 (5)
OWB	-9670 (40)	12120 (20)	3802 (12)	56 (5)
OWC	-5190 (40)	9820 (30)	5188 (12)	70 (7)

## Descripción estructural:

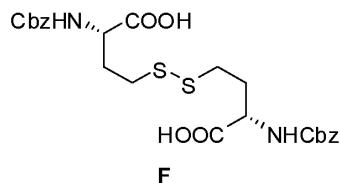
- 5 La unidad asimétrica está compuesta de una sola molécula de compuesto I asociada con 3 moléculas de agua. La Figura 2 presenta la unidad asimétrica de la molécula del compuesto I y las 3 moléculas de agua.

A lo largo del eje b, las moléculas sucesivas del compuesto I interaccionan vía dos tipos de enlaces de hidrógeno establecidos entre el átomo de oxígeno O1 A y el átomo de hidrógeno H (N1A) ( $d \sim 1,94 \text{ \AA}$ ), y entre el átomo de oxígeno O1 y el átomo de hidrógeno H (N1) ( $d \sim 1,99 \text{ \AA}$ ). A lo largo de un eje, dos moléculas consecutivas de compuesto I interaccionan vía un enlace de hidrógeno entre el átomo de oxígeno O2A y el átomo de hidrógeno H (N1A) ( $d \sim 1,98 \text{ \AA}$ ). Estas interacciones orientadas en direcciones a y b conducen a capas paralelas a (110). Además, una molécula de agua (OWA) se inserta entre estas moléculas y establece tres enlaces de hidrógeno diferentes: el primero une el átomo de oxígeno OWA al átomo de hidrógeno H (N1A) ( $d \sim 2,02 \text{ \AA}$ ), el segundo une el átomo de oxígeno O3A al átomo de hidrógeno H (OWA) ( $d \sim 1,94 \text{ \AA}$ ) y el último une el átomo de oxígeno O1 a H (OWA) ( $d \sim 1,97 \text{ \AA}$ ). Los cortes (110) presentan un grosor de  $d_{001}$  ( $\sim 17,5 \text{ \AA}$ ). Las diferentes interacciones dentro de estos cortes a lo largo de un eje se representan más específicamente en la figura 3. Dos capas consecutivas interaccionan a lo largo del eje c mediante enlaces de hidrógeno establecidos con las otras dos moléculas de agua OWB y OWC localizadas en planos (002). El átomo de oxígeno de la molécula de agua OWB establece enlaces de hidrógeno con el átomo de hidrógeno H (de NI) ( $d \sim 2,00 \text{ \AA}$ ), de un primer corte, y se conecta al siguiente corte vía

un enlace de hidrógeno con el átomo de oxígeno O3 y el átomo de hidrógeno H (de OWB) ( $d \sim 1,92 \text{ \AA}$ ). El átomo de oxígeno de la molécula de agua OWC establece un enlace de hidrógeno con el átomo de hidrógeno H (de NI) ( $d \sim 1,86 \text{ \AA}$ ) para un primer corte, y a continuación se une al corte adyacente por medio de dos enlaces de hidrógeno por medio de interacciones de dos átomos de oxígeno del resto sulfonato S2. El átomo de oxígeno O2 y el átomo de oxígeno O3 interaccionan con los dos átomos de hidrógeno de la molécula de agua OWC con longitudes de enlace de respectivamente  $d \sim 2,30 \text{ \AA}$  y  $d \sim 2,03 \text{ \AA}$ .

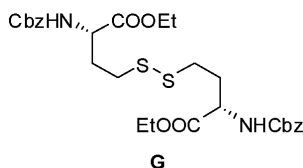
Ejemplo 3: Síntesis de (S)-2-(benciloxycarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo **A** a partir de L-homocistina.

Etapas (a-1): (2S,2S')-4,4'-disulfanodibis(ácido 2-(benciloxycarbonilamino)butanoico) **F**



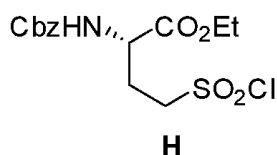
L-Homocistina (200,0 g, 745,5 mmol, 1,0 eq.) se suspende en THF (1.000 ml, 5,0 vol.) y se enfría a 5-10°C. La adición de hidróxido de sodio al 20% (521,7 ml, 626,2 g, 125,25 g al 100%, 3,13 mmol, 4,2 eq.) es seguida de adición de cloroforniato de bencilo (220,3 ml, 267 g, 1565,5 mmol, 2,1 eq.). La conversión se completa después de una noche a temperatura ambiente (L-homocistina <1%). Las extracciones y los lavados de la capa orgánica con agua conducen a un aceite amarillo que se aísla con rendimiento cuantitativo y que cristaliza lentamente en forma de un sólido amarillento a temperatura ambiente.

Etapas (b-1): (2S,2S')-4,4'-disulfanodibis(2-(benciloxycarbonilamino)butanoato) de dietilo **G**



**F** (140,0 g, 260,89 mmol, 1,0 eq.) se suspende en etanol puro (700 ml, 5,0 vol.) y se calienta a 50°C. La adición de  $\text{SOCl}_2$  (41,6 ml, 68,3 g, 573,96 mmol, 2,2 eq.) se realiza a 50°C para evitar la acumulación. La conversión es completa ( $F < 1\%$ ) después de 1 hora a 50°C. La concentración de la mezcla en bruto seguida de la disolución en acetato de etilo y los lavados de la capa orgánica conduce a una disolución transparente que está parcialmente concentrada. La adición lenta de 5,0 volúmenes de heptano conduce a la cristalización del producto deseado en forma de un sólido blanco. Después de la filtración y el secado, el bis-éster se aisló con un rendimiento del 92%.

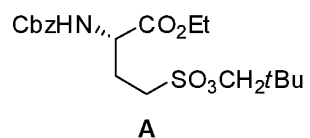
Etapas (c-1): (S)-2-(benciloxycarbonilamino)-4-(clorosulfonil)butanoato de etilo **H**



Se suspende **G** (100,0 g, 168,7 mmol, 1,0 eq.) en etanol (500 ml, 5,0 vol.) y se enfría a 5°C. La adición de  $\text{Cl}_2$  (83,7 g, 1,18 mol, 7,5 eq.) se realiza a  $T < 10^\circ\text{C}$ . La conversión es completa ( $G < 1\%$ ) cuando la mezcla de reacción es perfectamente homogénea. La disolución de cloruro de sulfonilo se vierte sobre una mezcla de una disolución acuosa de carbonato y tolueno, manteniendo la temperatura por debajo de 20°C. Los lavados de la capa orgánica, seguidos de la concentración a presión reducida, conducen al producto deseado en forma de un aceite incoloro con un rendimiento del 96,8%.

El producto esperado se puede aislar en forma de un sólido blanco cuando se añaden lentamente 5,0 volúmenes de heptano a una disolución concentrada de tolueno (2,0 vol.) del producto. Sin embargo, la pureza realmente no se mejora y el rendimiento disminuye drásticamente (75-80%). En consecuencia, el cloruro de sulfonilo **H** se aísla en 1,0 volumen de tolueno y se usa sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Etapas (d-1): (S)-2-(benciloxycarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonil)butanoato de etilo **A**



- 5 Se disuelve alcohol neopentílico (29,1 g, 329,84 mmol, 1,2 eq.) en tolueno (400 ml, 4,0 vol.) y una se añade disolución de **H** (100,0 g, 274,87 mmol, 1,0 eq.) en tolueno (100 ml, 1,0 vol.) a temperatura ambiente. La mezcla homogénea se enfría a continuación a 0°C. La adición de trietilamina (46,0 ml, 33,4 g, 329,84 mmol, 1,2 eq.) se realiza a 0°C. Al final de la adición, la mezcla se calienta a temperatura ambiente hasta que se completa la conversión (H <1%). Después de la hidrólisis con HCl diluido, la capa orgánica se lava con NaHCO<sub>3</sub>, agua y salmuera, y se concentra a presión reducida para dar el producto deseado en forma de un aceite amarillo pálido con un rendimiento del 94,4%.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico) a partir de (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-neopentiloxisulfonyl)butanoato de etilo **A** que comprende las etapas de:
- 5 (a) reducir el éster etílico de **A** para dar (S)-3-(benciloxicarbonilamino)-4-hidroxi-butano-1-sulfonato de neopentilo **B**;
- (b) hacer reaccionar el alcohol **B** con anhídrido metanosulfónico o cloruro de metanosulfonyl en presencia de una base para dar (S)-3-(benciloxicarbonilamino)-4-(metilsulfonyl)butano-1-sulfonato de neopentilo **C**;
- 10 (c) hacer reaccionar el alcohol mesclado **C** con tioacetato de potasio para dar tioacetato de (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonyl)butilo **D**;
- (d) dimerizar **D** para dar (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(3-(benciloxicarbonilamino)butano-1-sulfonato de neopentilo **E**; y
- (e) desproteger los grupos éster sulfónico y amina de **E** agitando **E** en una mezcla a reflujo de ácido trifluoroacético (TFA) y anisol, para dar (3S,3S')-4,4'-disulfanodiilbis(ácido 3-aminobutano-1-sulfónico).
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) se realiza haciendo reaccionar **A** con un agente reductor - pareja de disolventes seleccionada de NaBH<sub>4</sub>/LiCl - mezcla de tetrahydrofurano (THF) y etanol y LiBH<sub>4</sub> - THF, a una temperatura de alrededor de 0°C a 25°C, o preferentemente la etapa (a) se realiza haciendo reaccionar **A** con LiBH<sub>4</sub> - THF a una temperatura de 20°C a 25°C.
- 20 3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa (b) se realiza en presencia de trietilamina como base, en un disolvente seleccionado de cloroformo y una mezcla de metil-(terc-butyl)-éter (MTBE) y tolueno, a una temperatura de -10°C a 10°C.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se realiza haciendo reaccionar **B** con cloruro de metanosulfonyl, en presencia de trietilamina como base, en una mezcla de MTBE y tolueno con una relación en volumen de 3:2, a una temperatura de alrededor de 5°C a alrededor de 10°C.
- 25 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (c) se realiza en un disolvente seleccionado de etanol y acetona, o preferentemente la etapa (c) se realiza en acetona a una temperatura de 15°C a 25°C.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (d) se realiza poniendo en contacto **D** con hidróxido de sodio, en etanol, y haciendo reaccionar la mezcla obtenida con yodo, en etanol, a una temperatura de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C.
- 30 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa (e) se realiza agitando **E** en una mezcla a reflujo de TFA y anisol con una relación en volumen de 5:1
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la purificación del producto final se realiza por recristalización en agua.
- 35 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el producto final se obtiene como una de sus formas hidrato, preferentemente su forma trihidrato.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-9, en el que **A** se prepara a partir de L-homocistina mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
- 40 (a-1) hacer reaccionar L-homocistina con cloroformiato de bencilo para dar ácido (2S,2S')-4,4'-disulfanodiilbis(2-(benciloxicarbonilamino)butanoico) **F**;
- (b-1) llevar a cabo una reacción de esterificación entre **F** y etanol para dar (2S,2S')-4,4'-disulfanodiilbis(2-(benciloxicarbonilamino)butanoato) de dietilo **G**;
- (c-1) escindir oxidativamente el enlace disulfuro de **G** para dar (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(clorosulfonyl)butanoato de etilo **H** y
- 45 (d-1) hacer reaccionar **H** con alcohol neopentílico para dar (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(neopentiloxisulfonyl)butanoato de etilo **A**.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa (a-1) se realiza en THF en presencia de hidróxido de sodio, a una temperatura de 15°C a 25°C.

12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en el que la etapa (b-1) se realiza haciendo reaccionar **F** con cloruro de tionilo, en etanol puro, a una temperatura de 45°C a 55°C.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la etapa (c-1) se realiza haciendo reaccionar **G** con cloro, en etanol, a una temperatura de 5 a 10°C.
- 5 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la etapa (d-1) se realiza en presencia de trietilamina, en tolueno, a una temperatura de 15°C a 25°C.

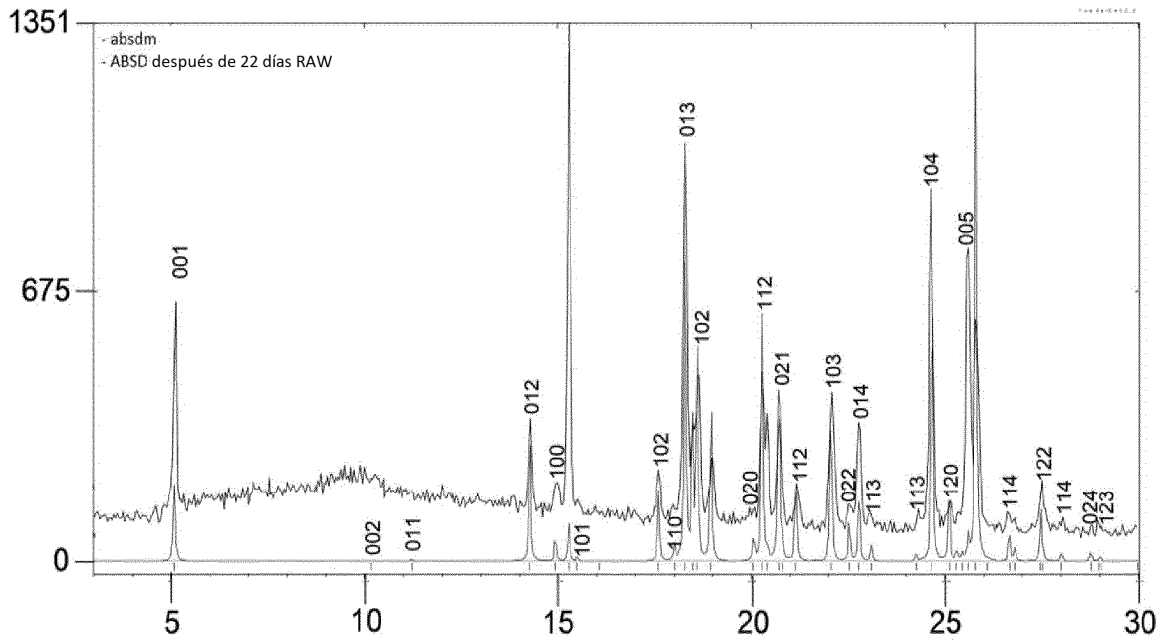


Figura 1

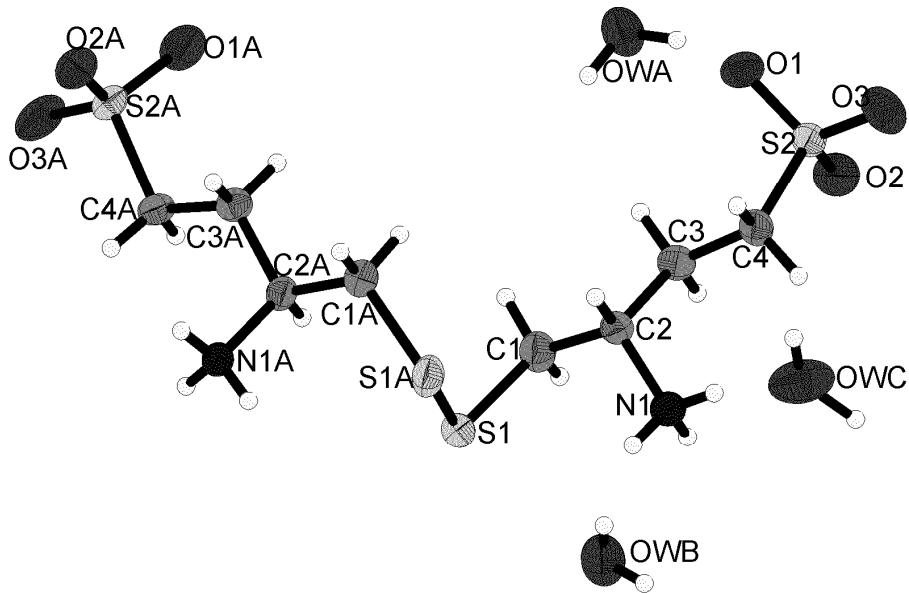


Figura 2



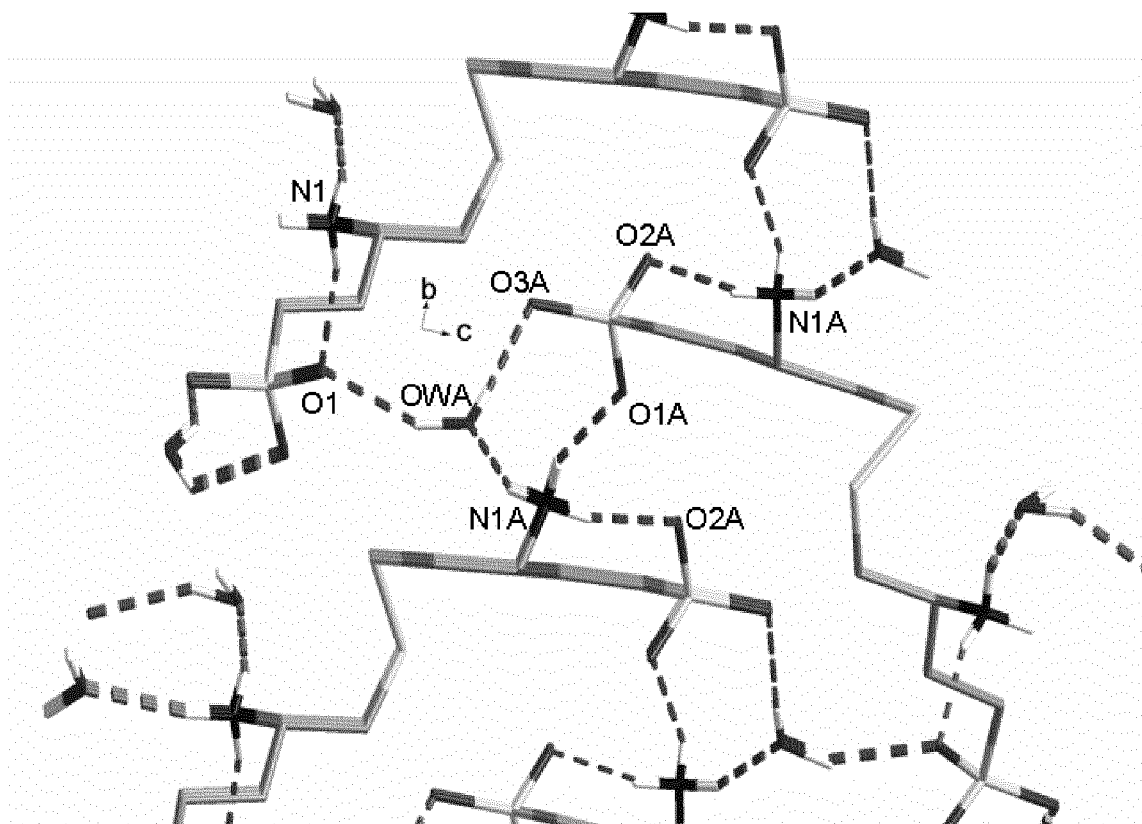


Figura 3