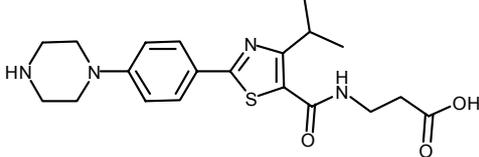
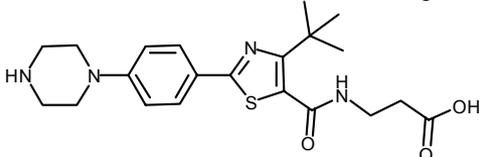
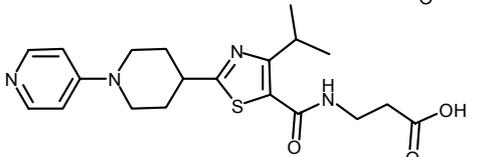
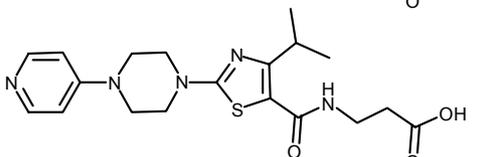


1. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La primera incursión del Departamento de *Drug Discovery* de J. Uriach & Cía en el desarrollo de antagonistas que tuvieran como receptores integrinas, se llevó a cabo como en la mayoría de compañías en el campo de los antagonistas de la GPIIb-IIIa.

Como resultado de una primera fase exploratoria se encontraron varias moléculas que se consideraron los primeros *hits*, o compuestos de actividad destacable, de esta línea de investigación. A su vez estos *hits* fueron desarrollados y se obtuvieron cuatro moléculas líderes con actividades *in vitro* cercanas a las de las moléculas de la competencia. Estos resultados quedaron enmarcados en la preparación del Máster en Química Experimental y fueron presentados en la Universidad de Barcelona en febrero de 2000. Estas moléculas y sus actividades *in vitro* se encuentran en la tabla 1.1

Tabla 1.1

Compuesto	Estructura	Inhibición de la agregación plaquetaria (hombre PRP/ADP CI_{50} (nM))
UR-12826		250
UR-12838		170
UR-12850		500
UR-12851		650

Estos líderes fueron sometidos a un proceso de *modificación del líder* en nuestro departamento con el objetivo de encontrar un candidato para entrar en fase clínica. Se estudió la naturaleza del radical básico, diferentes sustituciones hidrofóbicas en el

anillo del tiazol y diferentes sustituyentes hidrofóbicos en las posiciones α y β del β -aminoácido.

De este estudio se eligió al **UR-12947** como candidato para el desarrollo de un antagonista de los receptores del fibrinógeno activo por vía oral.

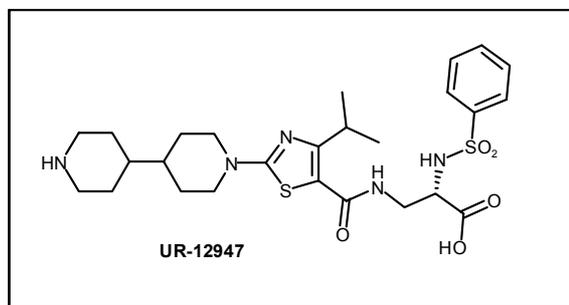


Figura 1

En el momento en que el **UR-12947** fue elegido para su desarrollo clínico se planteó en el departamento de Química Médica la necesidad de optimizar la síntesis de este compuesto, con el objetivo de obtener un primer lote destinado a los primeros ensayos clínicos y en segundo lugar para producir dicha molécula a escala industrial en el momento en que los resultados clínicos fueran satisfactorios.

Así pues, en la presente tesis doctoral, en este primer capítulo nos centramos en el desarrollo de un esquema sintético optimizado para la producción en planta piloto del **UR-12947** con el menor coste económico posible. Se intentaron sustituir todos aquellos reactivos y disolventes que no fueran aptos para la escala industrial, y fueron reemplazados por aquellos que respetaban el compromiso entre productividad y seguridad medioambiental.

2. SINTESIS DEL UR-12947

La primera vez que se sintetizó el **UR-12947** se obtuvo con un rendimiento global aproximadamente del 0,8 %, para un total de 10 pasos sintéticos. Si bien en aquel momento el objetivo era obtener el mayor número de moléculas para su *screening* farmacológico, una vez seleccionado el **UR-12947** para su estudio en clínica, surgió la necesidad de optimizar su síntesis y adecuarla para su ejecución en Planta Piloto.

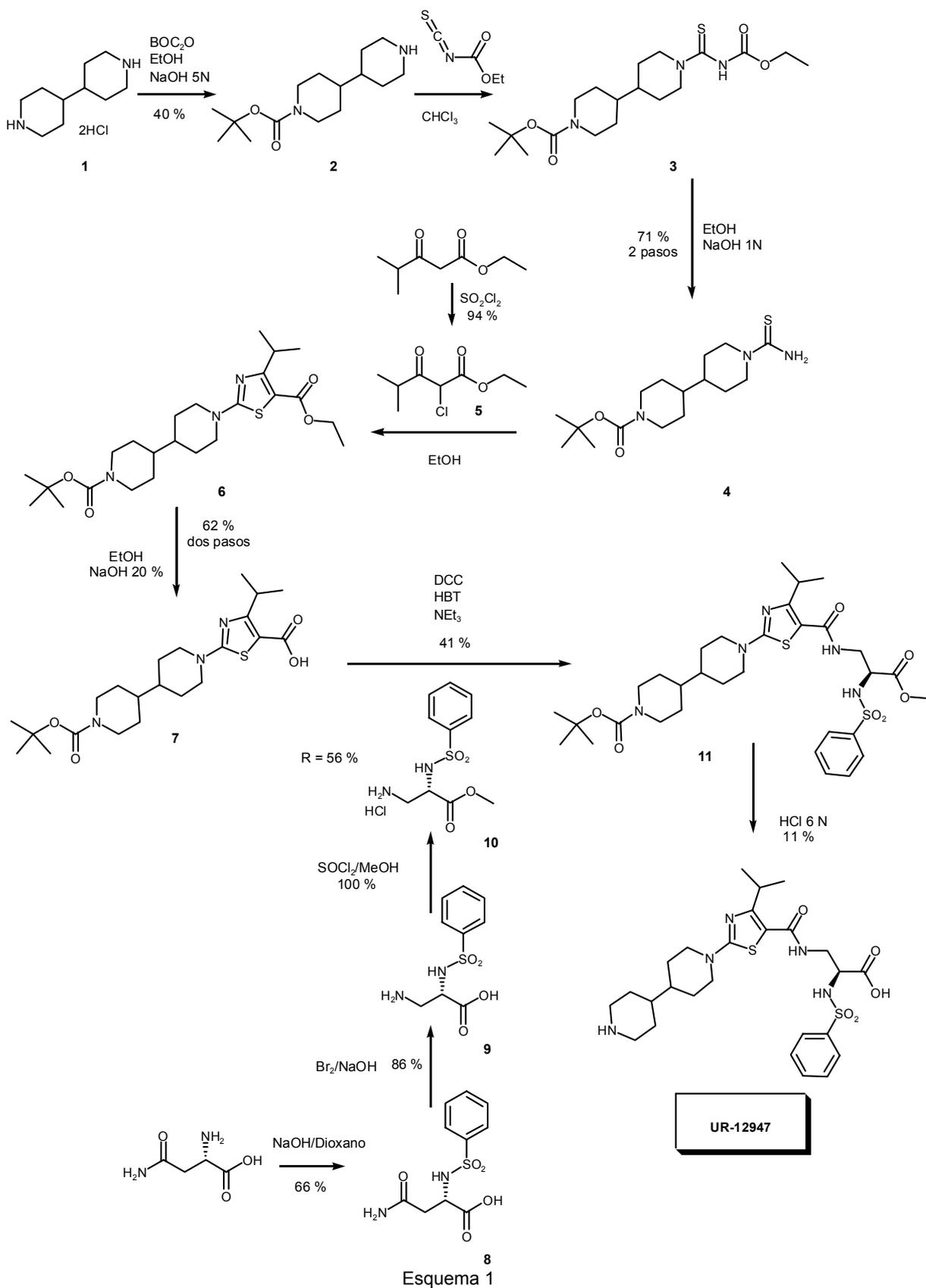
El esquema de síntesis que se llevó a cabo para la primera obtención del **UR-12947** se encuentra en el Esquema 1 de la página siguiente.

Como podemos observar, se trata de una síntesis convergente si bien algunas conversiones son lineales. No obstante, consideramos la ruta sintética correcta, y nos centramos en optimizar cada una de las reacciones que consideramos que presentaban aspectos negativos, como bajo rendimiento, dificultad en el aislamiento del producto (necesidad de cromatografía en columna, tratamientos tediosos, eliminación de impurezas orgánicas e inorgánicas, etc...), baja reproducibilidad del experimento o presencia de reactivos nocivos. En la medida en que nos fue posible, también intentamos llevar a cabo variaciones que pudieran reducir el número total de pasos.

Así pues, en los siguientes capítulos se detalla el análisis realizado en cada una de las reacciones del Esquema 1. Se estudió la problemática particular de cada una, y una vez extraídas las conclusiones de dicho estudio, se aplicaron las mejoras necesarias en cada reacción.

A excepción de la α -clorocetona **5** (rdto: 94 %) y el hidrocloreuro del 3-amino-2(S)-(bencenosulfonilamino)propionato de metilo **10** (optimizado anteriormente por nuestro grupo de investigación), todos los demás intermedios sufrieron modificaciones, bien en las condiciones de reacción o bien en el tratamiento. Especialmente importante era la optimización de los dos pasos finales (obtención de **11** y del **UR-12947**) debido a su bajo rendimiento y a ser los pasos finales de la síntesis, con lo que se producía una gran pérdida de producto.

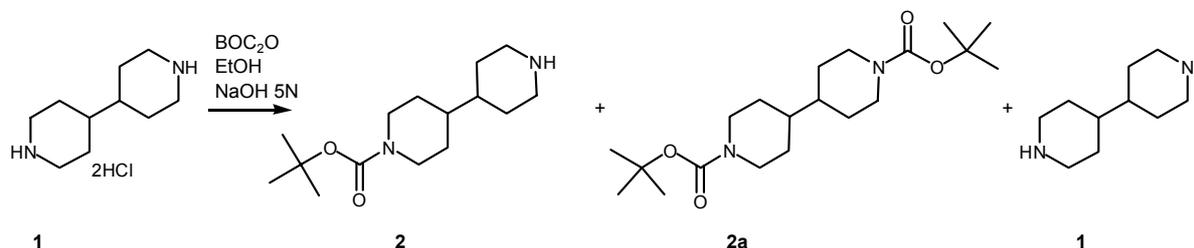
SÍNTESIS DEL UR-12947



Esquema 1

2.1 Síntesis de la 1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidina (2)

2.1.1 Primera síntesis



Esquema 2

La 1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidina (2) había sido sintetizada anteriormente por varios grupos de investigadores. Este compuesto fue preparado en Smithkline-Beecham para la síntesis del Lotrafiban¹ (un antagonista de la integrina GPIIb-IIIa en fase III). Más adelante también fue sintetizado por Lowe et al.² en Schering Corporation dentro de un programa de desarrollo de antagonistas muscarínicos y por Zheng et al.³ en Biogen Inc. que la había descrito en una patente sobre antagonistas de la VLA-4.

En la obtención de los primeros lotes de este compuesto en nuestro departamento, seguimos la metodología descrita por los colaboradores de Smithkline-Beecham en la patente WO 94/14776.⁴ Para ello se disolvía el dihidrocloruro de 4,4'-bipiperidina (1) en H_2O (4 mL/g) y NaOH 5N (ajustando a $\text{pH}=8-9$) y se diluía con EtOH (48 mL/g). Sobre esta solución se añadía, rápidamente y a temperatura ambiente una solución que contenía 1,1 equivalentes de dicarbonato de di-*tert*-butilo en EtOH (33 mL/g). Durante 5 h se agitaba a temperatura ambiente y se mantenía el pH entre 8 y 9 mediante adiciones sucesivas de NaOH 5N .

En el tratamiento que llevaban a cabo durante la síntesis del Lotrafiban se aislaba el compuesto 2 del medio de reacción, que además de contener producto de partida 1 también contenía el subproducto 2a, mediante extracciones líquido-líquido a diferentes pH s. Así pues, una vez concluido el tiempo de reacción, la solución se trataba evaporando el EtOH a presión reducida. El residuo se disolvía en una mezcla 1:1 de H_2O /éter dietílico (40 mL/g) y se llevaba a $\text{pH}=12$ con NaOH 5N . Después de extraer la fase acuosa (aq_1) con éter dietílico tres veces, la fase orgánica (O_1) era

¹ a) Samanem, J.M, et al.; *J. Med.Chem*, 39, **1996**, 4867-4870. b) Carey, J.S. et al.; *Tet. Lett.*42, **2001**, 4915-4917. c) Liu, F., et al.; *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 9(11), **2000**, 2673-2687

² Lowe, D.B. et al; WO 98/05292

³ Zheng, Z. et al.; WO 98/04247

⁴ Bondinell, W. et al.; WO 94/14776

lavada secuencialmente con $\text{NaCl}_{(\text{sat})}$ (aq_2) y con una solución de ácido cítrico al 3% (aq_3). Entonces esta fase acuosa (aq_3) se llevaba a $\text{pH}=12-13$ con NaOH 5N y se extraía con AcOEt tres veces (O_2). Esta solución orgánica (O_2) se secaba con Na_2SO_4 y después de eliminar el disolvente a presión reducida se obtenía el compuesto **2** con un rendimiento que variaba entre el 40 y el 45 %. La patente de Smithkline Beecham describía un rendimiento del 62 % para esta reacción, si bien en las cuatro veces que realizamos la operación con estas condiciones no llegamos a alcanzar este rendimiento. En el análisis por $^1\text{H-RMN}$ de la fase acuosa 1 (aq_1), vimos que contenía la biperidina **1** que no había reaccionado, y en la fase orgánica 1 (O_1) se hallaba la 1,1'-(di-*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-biperidina **2a** pero también había compuesto **2** que no se había retenido en la fase acuosa con ácido cítrico. Esta solución se lavaba con ácido cítrico 3 % hasta que no quedaba más producto deseado en la fase orgánica. De esta forma se conseguía el rendimiento que hemos descrito, pero lejos del publicado por los investigadores de Smithkline-Beecham.

2.1.2. Optimización

Cuando nos planteamos la optimización de esta reacción tuvimos en cuenta por un lado la mejora de las condiciones de reacción, para intentar generar el compuesto deseado en una proporción mayor, y por otro lado la mejora del tratamiento para conseguir una obtención óptima del producto, e intentar evitar la tediosa recuperación total de la molécula.

El primer cambio que introdujimos fue alargar el tiempo de reacción, de 5 a 18 h pero no hubo cambios significativos durante el tratamiento de la reacción. Los rendimientos fueron en general inferiores, entre el 30 y el 43 %.

El siguiente cambio lo realizamos en el tratamiento. En el seno de la reacción hemos comentado que teníamos tres especies a separar, las tres de polaridades muy diferentes. Por un lado el compuesto de partida es muy polar, el subproducto **2a** muy apolar y el compuesto **2** con una polaridad intermedia. Además tanto la molécula **2** como la **1** tienen aminas secundarias (con $\text{pKa}=11,3$), por lo tanto ionizables. En Química Médica hay un parámetro que describe la lipofilidad (o afinidad de una molécula por un entorno lipófilo o hidrófobo) llamado $\log D^5$ (que es la curva que representa el coeficiente de partición $\text{H}_2\text{O}/\text{octanol}$ ($\log P$) en función del pH) . Si observamos los valores teóricos de esta variable calculada con el programa Pallas⁶ son:

⁵ Han van de Waterbeemd, et al.; *J.Med.Chem.* 44, 9, 2001, 1313-1333

⁶ Pallas®. CompuDrug International, Inc. 1999

Tabla 2.1

Bipiperidina (1)		1'-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)- 4,4'-bipiperidina (2)	
pH	logD	pH	logD
0-7	-4,36	0-5	-1,41
7,40	-4,34	7,40	-1,34
8	-4,27	8	-1,18
9	-3,50	9	-0,51
10	-1,74	10	0,42
11	-0,06	11	1,26
12	0,74	12	1,66
13	0,88	13	1,74

Vemos, que a pH=10-11 la bipiperidina **1** tiene valores alrededor de -1 lo que indica que será muy soluble en medio acuoso, mientras que el compuesto **2** tiene valores alrededor de $+1$, lo cual indica que será más soluble en el disolvente orgánico. Teniendo en cuenta estos valores, tratamos una operación (realizada bajo condiciones estándar de reacción) evaporando el EtOH en primer lugar, a continuación, el residuo se llevó a pH=6 (a este pH los dos compuestos están ionizados y por tanto tienen logDs negativos) con una solución acuosa de NaHSO₄ 10 % (sabemos por nuestra experiencia que el grupo Boc es resistente en este ácido), y precipitó el compuesto **2a** que fue separado por filtración. A continuación la fase acuosa se llevó a pH=10-11 con NaOH 5N y se extrajo con AcOEt tres veces. Después de secar y concentrar el disolvente a presión reducida se obtuvo la molécula **2** con un rendimiento del 58 % (el producto de partida **1** se retiene en la fase acuosa a este pH).

Cuando cambiamos el disolvente de la reacción, los resultados fueron bastante inferiores a los obtenidos anteriormente. No sólo cambiamos el disolvente, sino que en aquellos que eran inmiscibles con H₂O también cambiamos la base. Los resultados de estas modificaciones se recogen en la siguiente tabla

Tabla 2.2

Operación	Disolvente	Base	pH reacción	t (h)	T (°C)	Rdto. (%)
1	THF	NaOH 2N	9	18	25	0
2	MeOH	NEt ₃	9	18	25	35,2
3	CHCl ₃	NEt ₃	9	18	25	0

El tratamiento fue diferente en cada caso en función de la naturaleza del disolvente y de la base. En la operación 1, filtramos el sólido que existía en el medio (su análisis confirmó que se trataba de **2a**) y después de evaporar el THF el residuo se repartió entre una solución acuosa (pH=10) y AcOEt. No se detectó el producto **2**. En la operación 2 eliminamos el MeOH y el residuo se repartió entre H₂O y hexano. El disolvente orgánico contenía la biperidina **2a** y la fase acuosa que se llevó a pH=10 con NaOH 5N contenía **1** y **2**. A este pH se extrajo con AcOEt con un rendimiento del 35 % en el producto deseado. Finalmente la operación 3 se trató directamente lavando con una solución de ácido cítrico al 5 %. La fase acuosa debía retener las moléculas ionizadas (**1** y **2**) mientras que la fase orgánica arrastró la molécula neutra (**2a**). Después de llevar la fase acuosa a pH=11 con NaOH 5N no se aisló el producto deseado.

De estos resultados concluimos que los disolventes apróticos favorecen la formación del compuesto **2a** en detrimento del producto deseado. Decidimos llevar a cabo una batería de experimentos para confirmar esta apreciación así como evaluar la influencia de variables tales como pH, temperatura, tiempo y tipo de base. En cada ensayo, partimos de 0,5 g (2 mmol) de 4,4'-biperidina dihidrocloruro (**1**) disuelta en un disolvente 1 (Dte.1), se diluyó con el disolvente 2 (Dte.2), y se llevó al pH adecuado con la base elegida. A continuación se añadió 1 equivalente de carbonato de di-*tert*-butilo disuelto en el disolvente 3 (Dte 3). Se agitó a la temperatura (T) indicada durante el tiempo (t) especificado para cada experimento y manteniendo el pH dentro de unos valores. Seguidamente, a 0 °C, la muestra se llevó a pH=6 con HCl 3N, concentramos a sequedad y analizamos mediante HPLC (condiciones detalladas en la Parte Experimental). La proporción que existe entre los compuestos **2:2a** ya que el compuesto **1** no se detecta en estas condiciones de HPLC, así como los demás datos de estas pruebas se recogen en la siguiente tabla 2.3:

Tabla 2.3

Operación	Dte 1	Dte 2	Dte 3	t (h)	T(°C)	pH _i	pH _f	Base	Proporción 2:2a
1	2 mL H ₂ O	4 mL THF	4 mL THF	2	0-25	9,2	9,3	NaOH 5N	0:100
2	10 mL DMF	-	-	2	0-25	-	-	NEt ₃	0:100
3	2 mL H ₂ O	4 mL MeCN	4 mL EtOH	1	0-25	9	9,3	NaOH 5N	62:38
4	2 mL H ₂ O	4 mL EtOH	4 mL EtOH	2	0-25	9,7	10	K ₂ CO ₃	43:57
5	2 mL H ₂ O	4 mL EtOH	4 mL EtOH	1	0-25	9,1	9,3	NaOH 5N	68:32
6	2 mL H ₂ O	4 mL EtOH	4 mL EtOH	3	-10	8,2	8,9	NaOH 5N	66:34
7	8 mL H ₂ O	-	2 mL EtOH	1	0-25	11	10,6	NaOH 5N	40:60
8	2 mL H ₂ O	4 mL EtOH	4 mL EtOH	1	0-25	7,8	8	NaOH 5N	60:40
9	2 mL H ₂ O	4 mL EtOH	4 mL EtOH	5 min	0-25	-	-	NaOH 5N	34:66
10	2 mL H ₂ O	4 mL EtOH	4 mL EtOH	5 min	-10	-	-	NaOH 5N	57:43

Estos resultados nos confirmaron por un lado el hecho que los disolventes apróticos no son válidos para esta reacción (operaciones 1 y 2), mientras que la combinación entre EtOH y un disolvente aprótico (acetonitrilo) es tolerada (operación 3), pero no supone una mejora respecto al uso de EtOH solo. Consideramos que el EtOH no ha de ser sustituido.

Anteriormente habíamos usado NEt₃ como base y no habíamos mejorado los resultados, el uso de K₂CO₃ (operación 4) tampoco mejora el resultado y en principio no es una variable a mejorar. Si nos fijamos en el pH, vemos que realizamos el mismo experimento con tres valores: $\cong 9$ (operación 5), $\cong 11$ (operación 7), $\cong 8$ (operación 8). Si bien no aparecen grandes diferencias, cuando la reacción se lleva a cabo a pH $\cong 9$, los resultados son ligeramente favorables, mientras que a pH $\cong 8$ es algo inferior el resultado. En las operaciones 9 y 10, que tienen un tiempo de reacción de 5 minutos, observamos que cuando se ralentiza la reacción a baja temperatura (operación 10), es más rápida la formación del compuesto **2** respecto a la del **2a**, mientras que a temperatura ambiente se produce el hecho contrario (operación 9). Cuando se utilizan las mismas condiciones pero con tiempos de reacción más largos (operaciones 5 y 6), las proporciones se equilibran y apenas hay diferencias.

Con la información obtenida en estas operaciones llevamos a cabo una serie de lotes de producto en mayor escala. Dado que las variables tiempo y temperatura parecían ser las que mayor diferencias de resultados producían, realizamos diferentes

lotes de producto con distintos valores de temperatura y tiempo con el fin de fijar estas variables en reacciones con mayor peso. La base siguió siendo NaOH 5N, el disolvente EtOH y el pH alrededor de 9. El tratamiento de la reacción fue: interrupción de la reacción con HCl 3N (en frío y gota a gota para evitar concentraciones puntuales de HCl que pudieran dar un pH inferior a 6), entonces, se filtró el sólido formado a este pH (compuesto **2a**) y se evaporó el disolvente orgánico. A pH=6 se extrajo con hexano tres veces (compuesto **2a**). Con NaOH 5N, se llevó la solución acuosa a pH=10,2 y se extrajo con AcOEt tres veces, se secó el disolvente con Na₂SO₄ y después de evaporar a presión reducida, se analizó y se cuantificó tanto el compuesto **2** obtenido, como el **2a**. El resultado de estos experimentos fue:

Tabla 2.4

	Peso 1 (g)	EtOH ₁ (mL)	H ₂ O (mL)	Boc ₂ O (eq.)	EtOH ₂ (mL)	pH	t (h)	2 (g)	2a (g)	T(°C)	Rdto. de 2
1	25	100	80	1,05	100	9	3	11,7	11,4	25	44
2	150	600	480	1,05	600	9	18	45	120	25	37
3	100	800	400	1,05	800	9	18	50	53	6,5-8	45
4	100	800	400	1,05	800	9,5	1	37,1	42	10-12	33
5	10	80	40	1,05	800	10	4	5,67	3,5	Reflujo	32
6	100	800	400	1,05	800	9	18	31,5	55	25	43
7	10	80	40	1,05	80	10	3	6,68	4,80	-20	54
8	100	800	400	1,05	800	10	4	56,5	49,1	-15	50
9	100	800	400	1	800	9	3	74,5	19	-25	66
10	100	800	400	0,75	800	10	3	62,2	17,6	-15	74,6

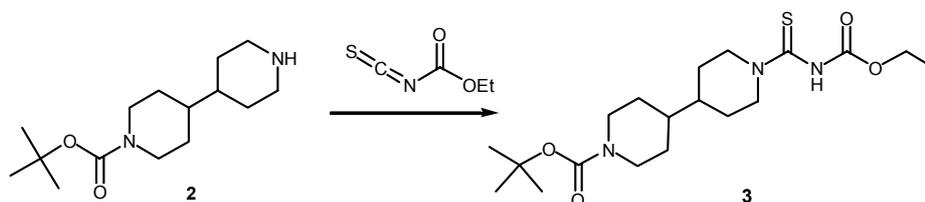
Las conclusiones que extraemos de estos experimentos son las siguientes:

- La reducción de disolvente afecta negativamente al rendimiento de la reacción (entradas 1 y 2)
- La temperatura óptima de reacción está entre -15 °C y -20 °C, (entradas 7 a 10), mientras que se observa una mayor proporción de compuesto **2a** al aumentar la temperatura (entradas 3 a 5).
- El tiempo de reacción idóneo para estas cantidades (100-150 g) estará en 3-4 h (entradas 7 a 10).
- Como ya habíamos observado, al aumentar la temperatura se favorece cinéticamente la formación de **2a**, por lo que existe una mayor proporción de este compuesto respecto a **2** (entrada 6).
- La reducción en la cantidad de Boc₂O, por un lado mantiene el rendimiento de las mejores condiciones y por otro lado reduce la formación de **2a**.

- En las operaciones 9 y 10, las aguas a pH=6 que contienen 4,4'-bipiperidina de partida se reciclaron. En primer lugar, se calcularon los moles que contenían estas aguas de dicho producto (restamos a los moles iniciales los moles que hemos obtenido de **2** y **2a**) y se llevó a cabo la reacción en las mismas condiciones que la operación precursora. El rendimiento que expresamos es el resultado de estas dos operaciones (evidentemente calculado sobre el número de moles de Boc₂O empleado que actúa como reactivo limitante)

En definitiva, tomamos las condiciones de la entrada 10 como las óptimas ya que además de reducir la cantidad de Boc₂O a un 75 % es la que mejores rendimientos nos aporta y la que mejor se reproduce, ya que en las diferentes ocasiones que llevamos a cabo la reacción con estas condiciones los resultados fueron aproximadamente los mismos.

2.2 Síntesis de la N-etoxicarbonil-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]carbotiamida (**3**)



Esquema 3

2.2.1 Primera Síntesis

La metódica empleada las primeras veces que sintetizamos la N-etoxicarbonil-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]carbotiamida (**3**) consistía en mezclar 1 equivalente de 1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidina (**2**) con 1 equivalente de isotiocianato de carboxietilo durante 4h a reflujo en CHCl₃, y a continuación se evaporaba a sequedad. Los crudos de reacción no eran purificados antes de su empleo en el paso siguiente y consecuentemente el rendimiento de esta reacción después del análisis por ¹H-RMN era tomado como cuantitativo.

El problema aparecía en el paso siguiente del esquema sintético, durante la hidrólisis de este compuesto, donde se obtenían rendimientos bajos. Nuestras sospechas sobre la posible causa de este hecho radicaban en la pureza del crudo de reacción. A pesar de que el espectro de protón revelaba un producto prácticamente

puro, las capas finas no eran del todo limpias. A tal efecto se intentó cromatografiar este intermedio pero los resultados no fueron los esperados (bajos rendimientos, problemas de separación de subproductos, etc...).

Al abordar la optimización de este paso nos propusimos:

- obtener un compuesto puro sin necesidad de cromatografiarlo y
- obtener un rendimiento elevado (>80%)

2.2.2 Optimización

Puesto que la evolución de la reacción, en general no parecía el problema de este paso, dado que el crudo de reacción tanto por CCF como por RMN indicaba mayoritariamente la presencia del producto deseado, lo primero que hicimos fue buscar un método de purificación que no precisara de una cromatografía en columna.

Obviamente, se pensó en buscar unas condiciones de recristalización adecuadas que dieran un producto puro, con un rendimiento aceptable y apto para su uso en planta piloto. Rápidamente se optó por el AcOEt como el disolvente más adecuado para nuestro propósito. Las pruebas llevadas a cabo recristalizando crudos que contenían 0,1 moles teóricos de producto dieron como resultado la obtención de 0,075 moles (75 % de rdto) como media de la N-etoxicarbonil-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]carbotiamida (**3**) pura (¹H-RMN correcto y CCF limpia).

Como la reacción se llevaba a cabo en CHCl₃ (disolvente no adecuado para su uso industrial) que era eliminado para recristalizar posteriormente el crudo en AcOEt, decidimos realizar la reacción directamente en AcOEt, con las mismas proporciones de reactivos y el mismo volumen de disolvente que habíamos utilizado anteriormente. Se siguió la evolución de la reacción a temperatura ambiente mediante CCF y después de 18 h no se detectaba producto de partida, por lo que desestimamos llevar a cabo el experimento con temperatura. En el medio de reacción se observaba gran cantidad de un sólido muy fino de color *beige*. Se enfrió la solución a 0 °C durante 1 h y el sólido se filtró y se secó en una estufa de vacío. Dicho sólido presentaba el mismo ¹H-RMN y la misma capa fina que el producto recristalizado anteriormente en AcOEt. Los rendimientos medios que se obtuvieron en estas operaciones fueron entre el 80 y el 90 %.

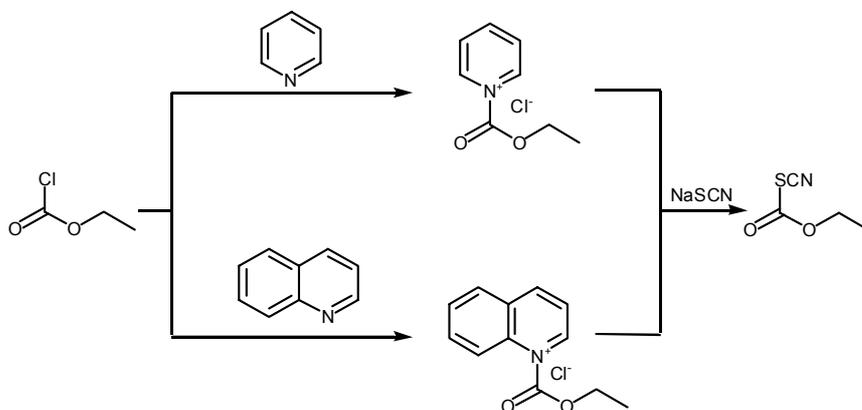
A pesar de obtener estos resultados altamente satisfactorios, existían algunos *batches* o lotes de producto que inexplicablemente daban rendimientos muy bajos (40-50 %). Los indicios apuntaban al posible estado del isotiocianato de carboxietilo, un reactivo que nos suministraba Aldrich (25 g, 156 euros) como posible causa de esta dificultad para reproducir los resultados. Analizando las operaciones que habían dado

rendimientos desfavorables, vimos que coincidían hechos como haber utilizado el mismo lote de isotiocianato de carboxietilo, o haber empleado un reactivo que llevaba tiempo en nuestro almacén de reactivos. La precaución que tomamos fue analizar el estado de este compuesto antes de emplearlo en ninguna reacción.

No obstante concluimos que nuestra reacción carecía de la robustez necesaria, dada la variabilidad en las condiciones de este reactivo. Así pues, nos planteamos sintetizar dicho reactivo para poderlo utilizar recién preparado y evitar los problemas derivados de su estado.

En la literatura está descrita la obtención y purificación del isotiocianato de carboxietilo, si bien advierten de las propiedades fuertemente lacrimógenas de dicho compuesto. M. E. Lewellyn y colaboradores de American Cyanamid,⁷ en el mismo artículo que describen su preparación también detallan la formación de las posteriores tioureas sin aislar dicho reactivo debido a sus características nocivas e irritantes.

Puesto que describían el isotiocianato de carboxietilo como un producto muy estable en solución acuosa siempre que la temperatura sea inferior a 12 °C, se realizó la reacción disolviendo 2 moles de tiocianato sódico en 150 mL de H₂O (Dte. 1) y 8 mL de piridina o quinolina (los autores destacan la importancia de la catálisis de piridina o de quinolina para obtener un rendimiento elevado, ya que la reacción transcurre a través de un intermedio de N-etoxicarbonilpiridinio o quinolinio) a una temperatura entre 8 y 12 °C (T 1).



Esquema 4

Gota a gota se adicionaban 2,03 moles de cloroformiato de etilo y se agitaba, a esta temperatura durante 4 h (Tiempo 1). Pasado este tiempo añadía HCl 10 % (36 g) para neutralizar la piridina o la quinolina. Sobre esta solución se adicionaba la amina correspondiente disuelta en tolueno (Dte. 2) a 0 °C (T 2). Después de 2 h (Tiempo 2), a esta temperatura se trataba repartiendo entre tolueno y H₂O y se analizaba el producto extraído. Los autores referenciaban rendimientos del orden del 95 %.

⁷ Lewellyn, M.E., Wang, S.S., Strydom, P.J.; *J.Org.Chem*, 55, **1990**, 5230-5231

Las pruebas que llevamos a cabo se hicieron con el propósito de optimizar los diversos parámetros que consideramos que podían tener influencia en el curso de la reacción. Para las dos etapas de la reacción se cambiaron tanto los disolventes, como los tiempos de reacción como las temperaturas. Además estudiamos diferentes proporciones molares entre los reactivos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2.5

	Eq. NaSCN	Dte 1	Catálisis	Eq. ClCOOEt	T 1 (°C)	Tiempo 1 (h)	Eq. 2	Dte 2	T 2 (°C)	Tiempo 2 (h)	Resultado 2:3:3a
1	1	H ₂ O	Piridina	1,01	8-12	4	1	THF	8-12 25	2 48	37:29:34
2	1	H ₂ O	Piridina	1,01	8-12	4	1	AcOEt	8-12 25	2 48	0:32:68
3	1	H ₂ O	Piridina	0,8	8-12	3	0,8	AcOEt	25	18	50:50:0
4	1	H ₂ O	Piridina	0,8	8-12	3	0,7	AcOEt	25	18	52:21:27
5	1	H ₂ O	Quinoleína	0,85	4-8	18	0,75	AcOEt	25	18	16:84:0
6	1	Acetona	Quinoleína	0,8	25	20 min	0,7	Acetona	25	18	5:95:0
7	1	Acetona	Quinoleína	0,8	25	1	0,7	Acetona	25	15	5:95:0
8	1	MeCN	Quinoleína	0,8	25	1	0,8	MeCN	25 Reflujo	18 1	0:100:0

En las primeras operaciones (entradas 1-4) seguimos unas condiciones muy similares a las descritas por Lewellyn y colaboradores, generando el isotiocianato de carboxietilo en H₂O y con catálisis de piridina. El resultado de estas pruebas no fue satisfactorio ya que se obtuvieron mezclas formadas por el producto de partida (**2**), el producto final (**3**) y el carbamato **3a** que es el principal subproducto. Las proporciones de estos tres compuestos fue determinada por ¹H-RMN, y son las indicadas en la tabla 2.5.

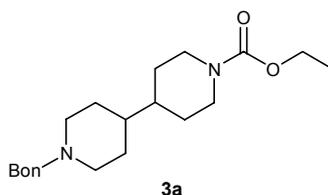
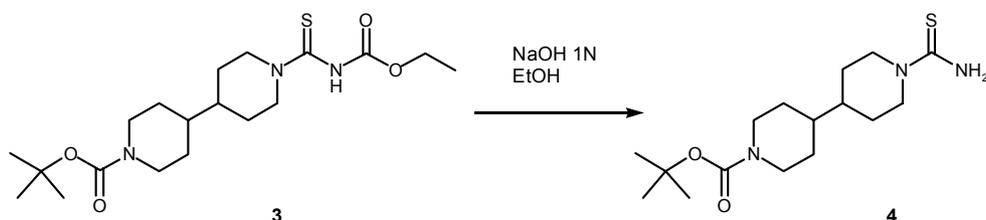


Figura 2

Ni el cambio de cosolvente ni las proporciones molares hizo mejorar los rendimientos. La causa de la formación del carbamato **3a** y la presencia de producto de partida sin reaccionar la atribuimos a una deficiente formación del isotiocianato durante la primera etapa de la síntesis. Por este motivo decidimos introducir cambios principalmente en la primera reacción. Optamos por utilizar catálisis de quinoleína en lugar de piridina y el resultado fue que se obtuvo un crudo que contenía un 84 % del producto deseado y el resto era producto de partida (entrada 5). Dado este excelente

resultado debido al cambio de catalizador, decidimos emplear la quinoleína en las siguientes pruebas. A continuación decidimos evitar las soluciones acuosas. Los resultados fueron muy satisfactorios al realizar la síntesis en acetona como único disolvente en las condiciones expuestas en la tabla 2.5. Se observó tan solo un 5 % aproximadamente de producto de partida (entradas 6 y 7). Por último se probó la síntesis en acetonitrilo y quinoleína (entrada 8) y los resultados fueron altamente satisfactorios, ya que después de estar la reacción a reflujo 1h, al enfriar y diluir al 50 % con H₂O, precipitaba un sólido puro con unos rendimientos de entre el 75 y el 85 %, todas las veces que repetimos la operación. En este punto consideramos la etapa como optimizada.

2.3 Síntesis de la [1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]carbotiamida (**4**)



2.3.1 Primera Síntesis

Tal y como hemos referido en el apartado 2.2.1, los primeros lotes de la carbotiamida **4** se prepararon a partir de partidas del precursor **3** que no habían sido purificadas de ninguna manera. Esta operación se hacía suspendiendo el compuesto **3** en un volumen (1,6 mL/mmol) de EtOH y NaOH 1N (1,6 mL/mmol). La mezcla se agitaba a reflujo durante 18 h. Transcurrido este tiempo el disolvente orgánico se eliminaba a presión reducida y la solución acuosa (pH>9) se mantenía a 4 °C durante 18 h. La carbotiamida **4** precipitaba en estas condiciones y después de filtrar y secar, se obtenían rendimientos entre el 50 y el 60 % como media. Tanto el análisis mediante HPLC como por ¹H-RMN del producto obtenido en estas condiciones, no evidenciaban la presencia de ningún subproducto.

2.3.2 Optimización

El primer cambio que realizamos fue el uso de un precursor **3** purificado, como consecuencia de la optimización llevada a cabo en el paso anterior. Siguiendo la

misma metódica que habíamos empleado con los precursores sin purificar, conseguimos rendimientos más elevados, del orden del 70-80 %. Sin embargo, algunos lotes resultaban impurificados con sales tal como revelaba el análisis elemental, y por consiguiente el rendimiento global era muy inferior al que habíamos referenciado.

Dado este resultado adverso, pensamos en obtener el producto por cristalización a pH=7 en lugar de a pH básico tal y como lo hacíamos. Así pues, una vez habíamos eliminado el EtOH, llevábamos la solución a pH=7 con HCl 3N a 0 °C. La solución acuosa se mantenía a 4 °C entre 8 y 18 h, y una vez transcurrido este tiempo se filtraba el sólido formado. El análisis de este sólido, tanto por ¹H-RMN como por HPLC evidenciaba la presencia de una impureza (no cuantificada) que no habíamos detectado mediante las diferentes cromatografías en capa fina que habíamos realizado.

Parecía claro que bajo nuestras condiciones de reacción se generaba una impureza que se mantenía soluble a pH básico, mientras que a pH neutro (condiciones en las cuales no se obtenían sales) coprecipitaba con nuestro producto. Antes que purificar estos sólidos nos planteamos seguir buscando unas condiciones óptimas de reacción.

Ya que no habíamos modificado hasta el momento las condiciones de reacción, pensamos en realizar cambios tanto en el solvente como en la base utilizada. Las tres modificaciones realizadas fueron las resumidas en la tabla 2.6:

Tabla 2.6

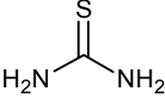
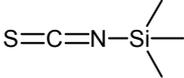
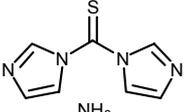
	Disolvente	Base
1	H ₂ O	NaOH 1N (6 eq.)
2	THF/H ₂ O	LiOH (1,25 eq.)
3	EtOH/H ₂ O	K ₂ CO ₃ (4,8 eq.)

Las reacciones se llevaron a cabo calentando 24 h a reflujo las mezclas indicadas en la tabla 2.6. A continuación se eliminó el disolvente orgánico de aquellas que lo contuvieran y se llevó a pH=7 con HCl 3N. Después se dejó la solución 18 h, a 4 °C y se filtró, se secó y se analizó el producto obtenido. Claramente las condiciones que corresponden a la entrada 3 fueron las que mejor resultado dieron. Tanto el espectro de protón como el HPLC se correspondía con un producto puro y el análisis elemental no indicaba la presencia de sales. Esta operación se repitió varias veces con lotes más grandes de producto y los rendimientos medios fueron del 80-90 %. Por este motivo consideramos estas condiciones como las más apropiadas.

2.3.3 Obtención directa de la [1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]carbotiamida (4).

La obtención de carbotioamidas primarias a partir de aminas primarias o secundarias en una sola etapa está ampliamente descrita en la literatura. La idea de llevar a cabo la síntesis de la [1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]carbotiamida (4) a partir de la 1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidina (2) se nos planteaba como muy atractiva. Por ello decidimos investigar las posibilidades que esta reacción ofrecía y probamos condiciones experimentales referenciadas en la literatura para la obtención de tioamidas a partir de aminas. Estas condiciones son las descritas en la tabla 2.7

Tabla 2.7

	Reactivo	Disolvente	Condiciones
1 ⁸		H ₂ O/THF	Reflujo 24 h
2 ⁹	KSCN/H ₂ SO ₄	Clorobenceno	Reflujo 3 h
3 ¹⁰		AcOEt	Reflujo 24 h
4 ¹¹	H ₄ ⁺ NS=C=N ⁻	DMSO	115 °C 24 h
5 ¹²		CH ₂ Cl ₂	t. a. 24 h

Todos estos experimentos dieron como resultado el aislamiento del producto de partida **2**, sin que se observase formación del compuesto **4**, ni por HPLC, ni por ¹H-RMN ni por CCF. En vista de que ninguna de estas condiciones apuntaba a la obtención de resultados favorables, decidimos no invertir más tiempo en esta reacción y aceptar como correcta la síntesis en dos etapas con las modificaciones que habíamos introducido para mejorar el rendimiento, la pureza y la reproducibilidad de las reacciones.

⁸ Wilson, M. et al.; *Eur.J.Med.Chem.Chim.Ther.*, 27, 8, **1992**, 799-808

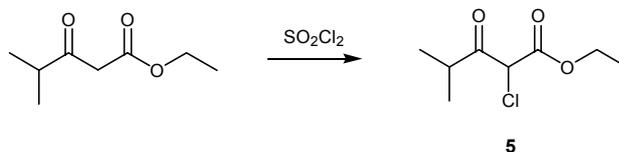
⁹ Allen, C.F.H., VanAllan, J.; *Org. Synth.* Vol.3, **1955**, 77-78

¹⁰ Feldman, P.L. et al.; *J.Med.Chem.*, 38,9,**1995**, 1505-10

¹¹ Kutbiddinov, Kh. K., et al.; *Dokl.Akad.Nank. Resp. Uzb.*, **1994** (5), 40-43

¹² a) Marsham, P.R., et al.; *J.Med.Chem.*, 34, **1991**, 1594-1605. b) Kempf, D.J. et al.; *J.Med.Chem.*, 41, **1998**, 602-617

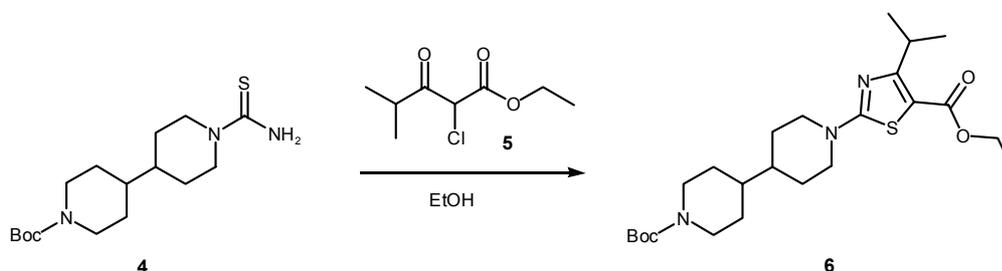
2.4 Síntesis del 2-cloro-4-metil-3-oxopentanoato de etilo (5)



Esquema 6

El 2-cloro-4-metil-3-oxopentanoato de etilo (**5**) se preparaba mediante la cloración del 4-metil-3-oxopentanoato de etilo con SO_2Cl_2 sin necesidad de ningún cosolvente. La mezcla se agitaba a temperatura ambiente durante 20 h, y se eliminaba el exceso de cloruro de sulfurilo a presión reducida. El compuesto puro se obtenía destilando el residuo al vacío ($t=68-72\text{ }^\circ\text{C}$ a 2-3 Torr). El rendimiento de esta operación se situaba entre un 95-100 % de un producto puro, por lo que no consideramos que este necesitase ninguna purificación adicional.

2.5 Síntesis del 2-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]isopropiltiazol-5-carboxilato de etilo (6)



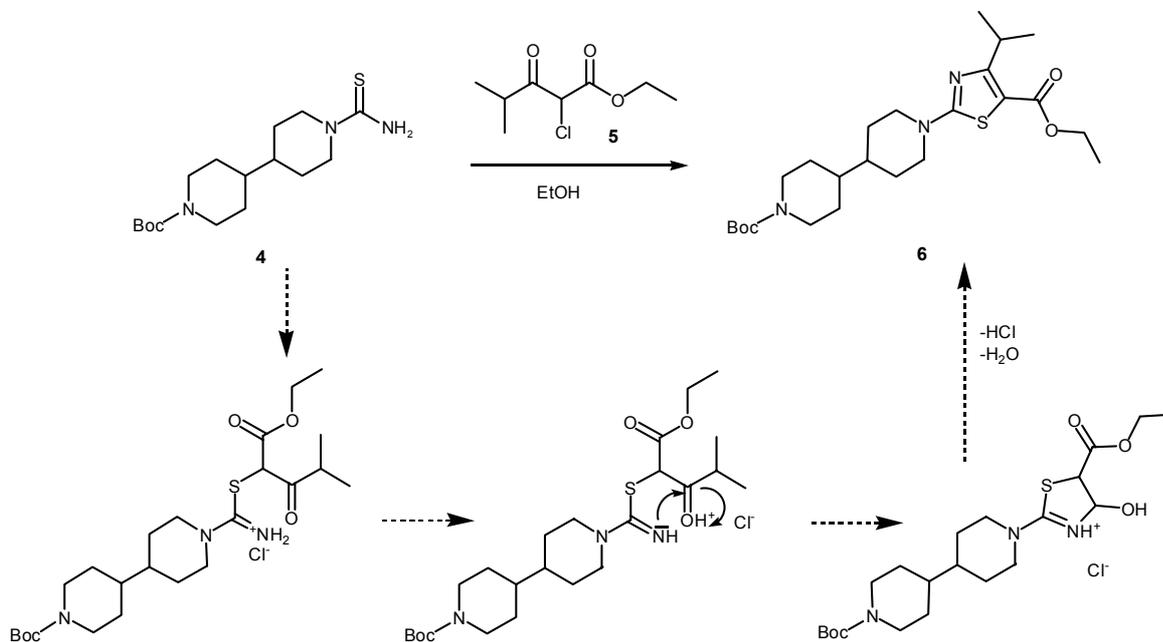
Esquema 7

2.5.1 Primera Síntesis

El tiazol **6** se preparó siguiendo la síntesis de Hantzsch,¹³ es decir mediante ciclocondensación de la α -clorocetona **5** y la tiourea **4** en EtOH a reflujo durante 18 h. El mecanismo de esta reacción transcurre a través de tres pasos intermedios: en primer lugar el átomo de cloro de la α -clorocetona es sustituido nucleofílicamente, en

¹³ Eicher, T., Hauptmann, S.; *The Chemistry of Heterocycles*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1995

la sal resultante hay una migración de un protón hacia el carbonilo y este intermedio es el que da lugar a la ciclación formando una sal de tiazolina. Esta sal en el seno de un disolvente prótico da lugar al tiazol 2,5-sustituido eliminando H₂O y HCl.



Esquema 8

El equivalente de HCl generado en esta etapa de ciclocondensación resultó ser suficiente para desproteger el grupo *tert*-butoxicarbonilo de la amina secundaria de la biperidina, con lo que el producto obtenido era el **7b**

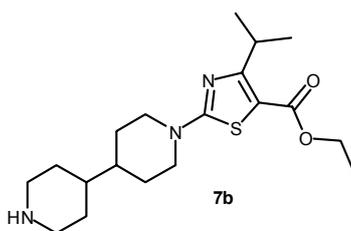


Figura 3

Una vez obtenido este intermedio era necesario volver a proteger dicha amina con dicarbonato de di-*tert*-butilo en CHCl₃ y NEt₃. El 2-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]isopropiltiazol-5-carboxilato de etilo (**5**) se obtenía en forma de crudo sin ninguna purificación adicional. No obstante, tal y como ya había sucedido en pasos anteriores el hecho de seguir la síntesis con un producto sin purificar se traducía en rendimientos más bajos en los pasos siguientes.

2.5.2 Optimización

En el proceso de optimización investigamos paralelamente unas condiciones de reacción que transcurrieran en un solo paso sintético con elevado rendimiento así como unas condiciones de purificación que nos proporcionasen un producto adecuado para proseguir la ruta sintética.

Dado que nuestro problema venía provocado por la desprotección de un grupo Boc, debido a la generación de un equivalente de HCl en el seno de reacción, lo más evidente sería introducir una amina terciaria en la reacción para captar dicho ácido clorhídrico. Por otro lado, pensamos que esta desprotección está favorecida por el hecho de calentar a reflujo la solución durante 18h (esto es necesario porque a temperatura ambiente la tiourea **4** no es soluble en EtOH y no reacciona). Por lo tanto, las condiciones de reacción que ensayamos se centraron en encontrar disolventes que fueran capaces de solubilizar la tioamida **4** sin necesidad de calentar a reflujo y en presencia de una base. Estas condiciones son las expresadas en la tabla 2.8:

Tabla 2.8

Entrada	Disolvente	Base	Temperatura	Tiempo
1	EtOH	NEt ₃	Reflujo	18 h
2	MeCN	NEt ₃	Reflujo	18 h
3	EtOH	-	50 °C	18 h
4	CH ₂ Cl ₂	-	25 °C	48 h
			50 °C	2 h
5	Acetona	-	Reflujo	48 h
6	DME	K ₂ CO ₃	25 °C	48 h
7	DMF	-	25 °C	48 h

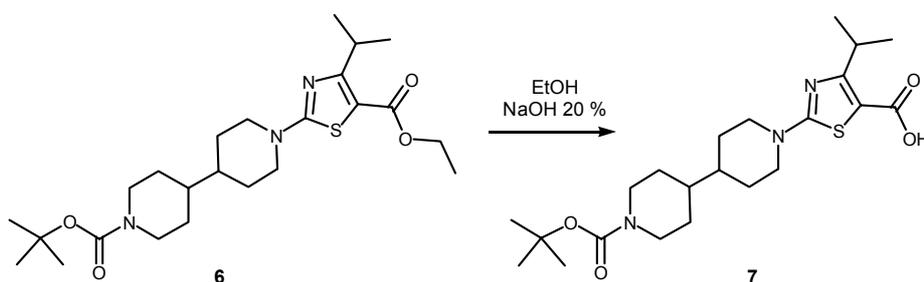
Los crudos de estas reacciones se analizaron mediante CCF y ¹H-RMN. Con las condiciones de reacción correspondientes a la entrada 6 prácticamente solo se obtuvo producto de partida. Esto debía ser porque la tioamida **4** era muy insoluble en DME a temperatura ambiente. Las condiciones de reacción 3 presentaban aproximadamente un 50 % de producto final y el resto de condiciones eran en general limpias y se formaba el tiazol **6** mayoritariamente. Especialmente las condiciones 1 y 4 eran las

más limpias y fueron elegidas para llevar a cabo síntesis con cantidades mayores de producto y probar condiciones de purificación.

Cuando realizamos la formación del tiazol **6** a partir de 19,7 g (0,060 mol) de la tioamida **4** en EtOH y NEt_3 a reflujo, el crudo obtenido después de repartir entre CHCl_3 y NaHCO_3 0,2 M se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice. El rendimiento para esta operación fue del 85 %.

Las condiciones de reacción descritas en la entrada 4 de la tabla 2.8 se llevaron a cabo con 10 g de la tioamida **4**. Esta reacción se hacía en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente y en ausencia de base. Antes de tratar se calentaba a 50 °C durante 2 h. El crudo se lavaba con NaHCO_3 0,2 M y una vez eliminado el CH_2Cl_2 a presión reducida, el residuo se recristalizaba en hexano a ebullición. Se obtuvieron 11,2 g de tiazol **6**, lo cual suponía un rendimiento del 80 % de producto cristalizado. Consideramos estas condiciones como las más adecuadas para esta reacción y no realizamos ninguna prueba adicional.

2.6 Síntesis del ácido 2-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]-4-isopropiltiazol-5-carboxílico (**7**).



Esquema 9

2.6.1 Primera síntesis

Durante la primera síntesis del **UR-12947**, la saponificación del 2-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]isopropiltiazol-5-carboxilato de etilo (**7**) usando $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ o $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ en EtOH a reflujo 18 h (a temperatura ambiente durante el mismo tiempo la hidrólisis del éster etílico era inferior al 5 %) era prácticamente cuantitativa tanto por CCF como por $^1\text{H-RMN}$. El principal problema era el aislamiento del ácido generado del medio de reacción. El tratamiento de esta reacción consistía en eliminar el EtOH a presión reducida y a continuación la solución acuosa se llevaba a $\text{pH}=7$ con una solución de NaHSO_4 5-20 % (este ácido es el que más respeta al grupo protector

tert-butoxicarbonilo). A 4 °C, el ácido pretendido precipitaba en estas condiciones después de 10-24 h. Sin embargo, el análisis elemental indicaba la presencia de una gran cantidad (50-60 % en peso) de sales inorgánicas (Na₂SO₄) incluso repitiendo la operación de disolver/precipitar en H₂O varias veces.

2.6.2 Optimización

En nuestro proceso de optimización, decidimos mantener las condiciones de reacción (NaOH 5N/EtOH a reflujo 18 h) y centramos en el tratamiento de la operación.

En la figura 5, se detalla el diagrama de flujo desarrollado para la primera optimización del aislamiento del ácido 2-[1'-(*tert*-butoxicarbonil)-4,4'-bipiperidin-1-il]-4-isopropiltiazol-5-carboxílico (**7**). En círculos señalamos los tres parámetros que posteriormente fueron objeto de mejoras:

- A. **pH:** en primer lugar decidimos bajar el pH de aislamiento que en principio era 7 hasta un pH=4. De esta forma pretendemos asegurarnos que el ácido está totalmente protonado.
- B. **Cosolvente:** por otro lado, la solución acuosa que contiene el ácido forma pastas enganchosas que dificultan la filtración, por ese motivo se añade un disolvente orgánico (que no disuelva el ácido **7**). Vimos que añadiendo AcOEt o CHCl₃ mejoraba visiblemente el aspecto de la solución.
- C. **Lavado con H₂O:** se realizan lavados con H₂O a diferentes temperaturas del sólido filtrado para eliminar las sales. En función de la temperatura veremos que se produce una impureza que es el tiazol descarboxilado **6a**, que es muy soluble en AcOEt. Por este motivo será necesario un lavado adicional en este disolvente.

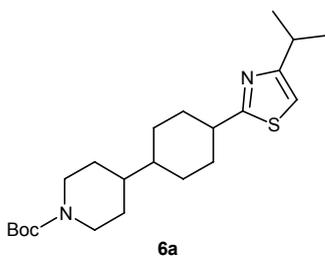


Figura 4

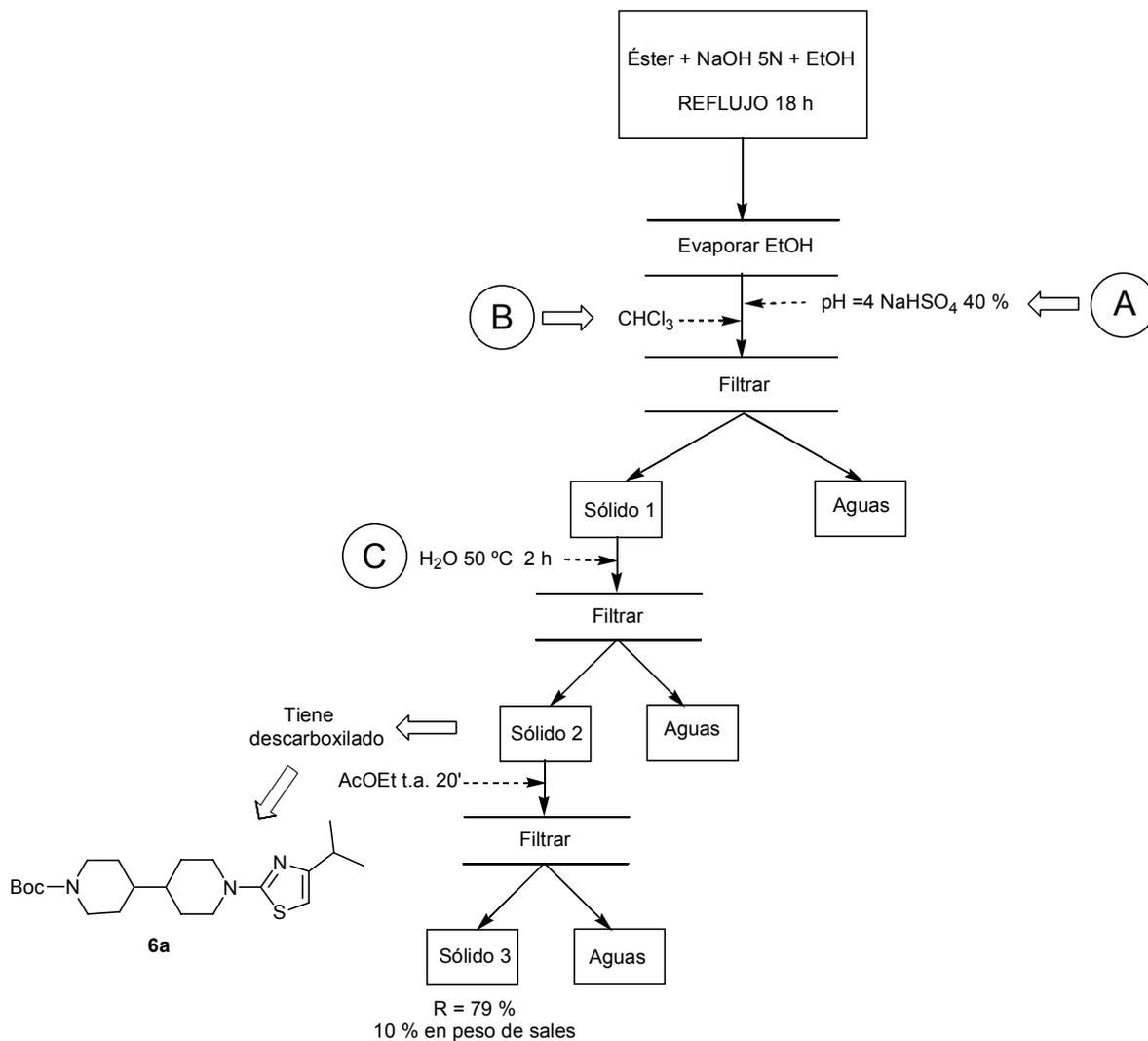


Figura 5

Los resultados de las diferentes condiciones de tratamiento que ensayamos para conseguir en rendimiento elevado de ácido **7** con la menor cantidad posible de sales se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 2.9:

Entrada	A	B	C	Desc.	Rdto.
1	pH=4 NaHSO ₄ 40 % t.a.	CHCl ₃	20 min (50 °C)	SI	79 % (10 % inorg.)
2	pH=7 HCl 3N pH=4 NaHSO ₄ 10 % 0 °C	-	15 min (35 °C)	SI	86 % (20 % inorg.)
3	pH=7 HCl 6N pH=4 NaHSO ₄ 20 % 0 °C	-	30 min(t.a.) x3	SI	64 % (5 % inorg.)
4	pH=7 HCl 6N pH=4 NaHSO ₄ 20 % t.a.	-	30 min(100 °C)	SI	Prácticamente descarboxilado
5	pH=7 HCl 3N pH=4 NaHSO ₄ 20 % -10 °C.	AcOEt	30 min (0 °C)	NO	>100 % (> 50 %)
6	pH=7 HCl 3N pH=6 NaHSO ₄ 20 % -10 °C.	AcOEt	30 min (t.a.)	NO	91 % (<5 % inorg.)

En las primeras operaciones (entradas 1-5), la solución acuosa inicial se llevó a pH=4: siempre hacíamos la neutralización con HCl_(aq) y a continuación se proseguía con NaHSO_{4(aq)} hasta conseguir el citado pH=4. El análisis de esta primera operación nos indicó que cuando se realizaba esta operación por encima de 0 °C se generaba el producto de descarboxilación **6a**. Este producto seguía generándose cuando se llevaba a cabo el lavado del producto en H₂O (operación C) por encima de 20 °C (temperatura ambiente). Concretamente en la entrada 4 donde la acidificación se realizó a temperatura ambiente y el sólido se suspendió en H₂O a ebullición, prácticamente solo aislamos el subproducto **6a**. En la entrada 5, vemos que cuando se acidificaba a -10 °C y se agitaba la solución acuosa a 0 °C, no se observaba producto de descarboxilación. Pero el inconveniente de reducir la temperatura en el lavado con H₂O es que al bajar la temperatura menos eficiente era el lavado y mayor la cantidad de sal en el producto final, tal y como vemos en los resultados expuestos en la tabla 2.10:

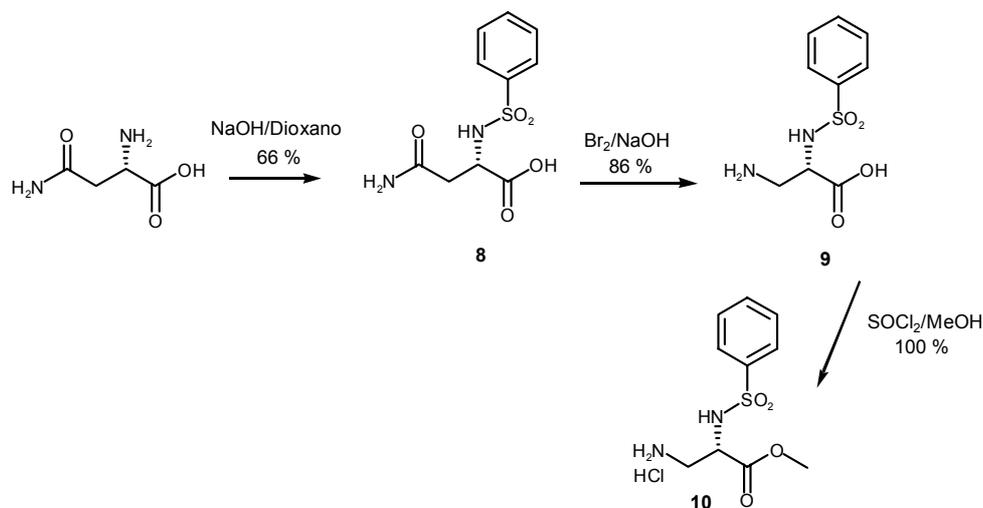
Tabla 2.10

Entrada	Temperatura	% inorg.
1	50 °C	10 %
2	35 °C	20 %
5	0 °C	>50 %

Las sales eran eliminadas después de sucesivos lavados, tal y como hicimos con la operación 4, que contenía inicialmente una gran cantidad de sales. Evidentemente este hecho se manifestó en el bajo rendimiento de la operación.

La operación 6 refleja el resultado de las mejoras introducidas a tenor de los datos recogidos en las anteriores operaciones: por un lado llevamos la solución acuosa inicial a un pH=6, para evitar la descarboxilación que a pH=4 es muy sensible a la temperatura. Se utilizó como cosolvente inicial AcOEt que facilita la filtración y no disuelve el producto, y finalmente se lavó el sólido con H₂O a temperatura ambiente, de esta manera se minimizó la presencia de sales en el producto final. Finalmente se realizó un lavado del sólido 2 con AcOEt para eliminar el posible subproducto **6a** formado. El resultado para esta operación fue excelente: rendimiento superior al 90 % y menos de un 5 % de sales.

2.7 Síntesis del hidrocloreto del 3-amino-2(S)-(bencenosulfonilamino)-propionato de metilo (**10**)



Esquema 10

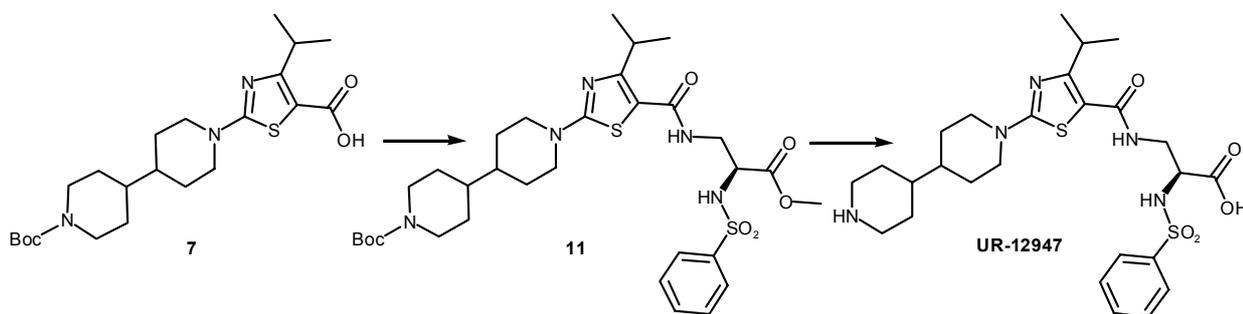
El hidrocloreto del 3-amino-2(S)-(bencenosulfonilamino)propionato de metilo (**10**) era un intermedio que habíamos utilizado anteriormente en nuestro laboratorio. Por este motivo cuando tuvimos que preparar una cierta cantidad de este producto seguimos la metodología optimizada por nuestro equipo. Partiendo de la L-asparagina, en primer lugar se formaba la sulfonamida **8** siguiendo las condiciones de Schotten-Baumann, es decir, se disolvía la L-asparagina en una mezcla de dioxano/H₂O 1:1. A 0 °C, se añadía 1,15 equivalentes de NaOH, y a una temperatura siempre inferior a 3 °C se adicionaba gota a gota 1,1 equivalentes del cloruro de bencenosulfonilo y 1,15 equivalentes adicionales de NaOH en H₂O. Después de agitar 1 h a 7 °C, se elimina el dioxano a presión reducida. La fase acuosa (pH básico), se extraía tres veces con AcOEt, a 0°C, se llevaban las aguas a pH=3 con HCl_{conc}. Precipitaba el intermedio **8** en forma de un sólido blanco (se lavó varias veces con H₂O y se secó en una estufa de vacío hasta peso constante). El rendimiento de esta primera etapa fue de un 85-90 %.

El ácido **8** se sometió posteriormente a una degradación de Hoffmann.¹⁴ Para ello se preparó una solución acuosa de NaOH (7,5 eq.) y Br₂ (1,3 eq.), sobre la cual se adicionó a 0 °C, una solución acuosa del ácido **8** (1 eq.) y NaOH (1,8 eq.). La mezcla se agitó 1 h a 0 °C y a continuación se agita 30 min a 90 °C. La solución resultante se llevó a pH=6,8 con HCl_{conc} (a 17-25 °C). Se mantuvo 2 días en la nevera (4 °C) y precipitó un sólido que se recogió mediante centrifugado. Este sólido se recristalizó en H₂O a ebullición, se volvió a dejar 2 días en la nevera (4 °C) y se volvió a separar el sólido mediante centrifugado. El rendimiento para esta operación se situó entre un 55 y 60 %.

Finalmente el aminoácido **9** se esterificó mediante su disolución y agitación en MeOH/SOCl₂ durante 3 h a 0 °C. Después de este tiempo, el disolvente se eliminó a presión reducida y el éster se obtuvo en forma del hidrocloreto **10** con un rendimiento cuantitativo.

¹⁴ Amato, J.S. et al.; *J.Org.Chem.*, 63, **1998**, 9533-9534

2.8 Síntesis del ácido 2(S)-(bencenosulfonilamino)-3-[N-[[2-(4,4'-bipiperidin-1-il)-4-isopropiltiazol-5-il]carbonil]amino]propionico (UR-12947)



Esquema 11

2.8.1 Primera síntesis

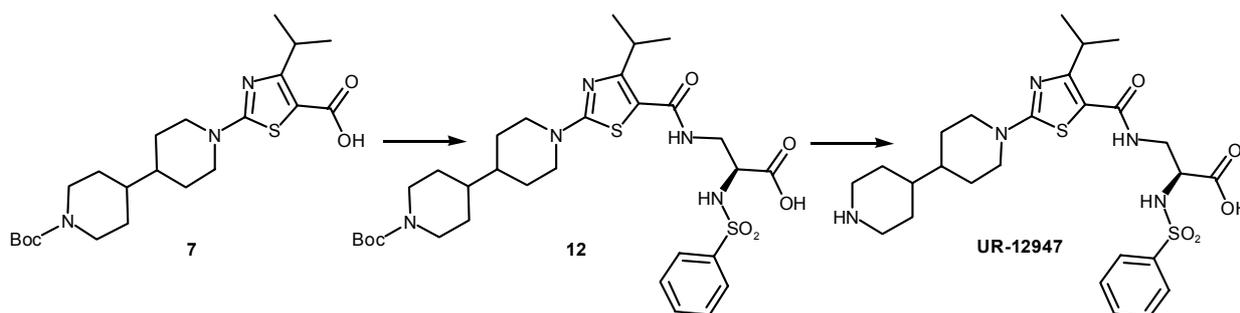
La obtención del **UR-12947** se realizaba en dos etapas: en la primera, el acoplamiento del ácido **7**, activado con DCC/HBT, y el hidrocloreto del aminoéster **10** en DMF y NEt_3 , daba unos resultados moderados (45-50 %) después de cromatografiar a través de gel de sílice. A continuación, en la segunda etapa debíamos hidrolizar el grupo *tert*-butoxicarbonilo y el éster metílico. Estas desprotecciones se podían realizar secuencialmente (condiciones básicas para saponificar el éster metílico, y condiciones ácidas suaves para desproteger el grupo *tert*-butoxicarbonilo) o bien hidrolizar las dos funciones simultáneamente en condiciones ácidas. Optamos por la segunda alternativa ya que suponía el ahorro de una operación. Se intentó la hidrólisis en HCl 3N/THF, pero después de 18 h a temperatura ambiente, si bien el grupo *tert*-butoxicarbonilo se había hidrolizado completamente, el éster metílico permanecía intacto. Para hidrolizar este éster se necesitaba usar HCl 6N/THF y agitar durante 48 h. Después de este tiempo, el tratamiento para aislar el **UR-12947** era tedioso: normalmente la hidrólisis no era del todo completa y el residuo en forma de hidrocloreto se purificaba mediante cromatografía sobre gel de sílice usando una mezcla EtOH:H₂O:NH₄OH 9:1:1,¹⁵ descrita para cromatografiar aminoácidos en forma de hidrocloreto. El producto cromatografiado se recrystalizaba en isopropanol/H₂O y finalmente se obtenía el **UR-12947** con unos rendimientos entre el 10 y el 20 %, con una pureza >98 %.

¹⁵ Egbertson, M. S., et al., *J. Med. Chem.*, 37, **1994**, 2537-2551

2.8.2 Optimización

Evidentemente tener una etapa final con un rendimiento tan bajo era un inconveniente muy importante para la síntesis global del **UR-12947**. Pensamos que las condiciones ácidas tan enérgicas necesarias para hidrolizar el éster metílico eran la principal fuente de problemas, ya que además de no completarse la reacción deseada (y por lo tanto fuese precisa una purificación en columna no escalable a nivel de planta piloto), se producían productos de degradación del **UR-12947**, y podría producir racemización en el producto.

Por todo esto, decidimos cambiar la secuencia sintética y llevar a cabo el coupling del ácido **7** con el aminoácido **9**, en lugar del aminoéster **10**. De esta forma se generaría el ácido intermedio **12**. En este momento la hidrólisis del grupo *tert*-butoxicarbonilo en condiciones ácidas más suaves (HCl 3N/THF), nos proporcionaría el **UR-12947** directamente (esquema 12). Esta secuencia además de ser más corta, evita la hidrólisis del éster metílico final y los problemas que ello conlleva.



Esquema 12

Empezamos ensayando condiciones para el acoplamiento entre el ácido **7** y el aminoácido **9**. El objetivo era mejorar el rendimiento obtenido anteriormente en esta primera etapa. A diferencia de la secuencia anterior, en el nuevo esquema pretendíamos acoplar un ácido con un aminoácido y no con un aminoéster, por lo que era clave crear una especie convenientemente activada del ácido capaz de reaccionar con la amina libre del aminoácido. Los diferentes métodos para activar el ácido que se probaron y los resultados obtenidos, se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2.11

Entrada	Ag. Condens	Esp. Int.	Dte.	Cond.	Rdto.
1 ¹⁶	DCC HBT		DMF	18 h /t. a.	0 %
2	DCC HBT NEt ₃ (1:2)		DMF	18 h /t. a.	47 %
3 ¹⁷	DCC NHS		CHCl ₃ DMF	18 h /t. a.	60 %
4 ¹⁸	CICOCOCI NEt ₃ 1:3		CH ₂ Cl ₂ DMF	18 h /t. a.	0 %
5 ¹⁹	SOCl ₂ NMM 1:2.5		Tolueno DMF	55 °C 3 h 18 h /t. a.	0 % (Desc.)
6 ²⁰	Cloruro pivaloilo NEt ₃ 1:4		CH ₂ Cl ₂	18 h /t. a.	0 %
7 ²¹	Cloroformiato de isobutilo NEt ₃ 1:4		CH ₂ Cl ₂	18 h /t. a.	0 %
8 ²²	MsCl 1:1 DMAP NEt ₃ 1:3		MeCN	18 h /t. a.	0 %
9	MsCl 1:1 NEt ₃ 1:3		CH ₂ Cl ₂	18 h /t. a.	6 %

Los métodos que transcurrían a través de la formación de un cloruro de ácido (entradas 4-5) o a través de diferentes especies de anhídrido mixto (entradas 6-9), dieron resultados muy desfavorables (tan solo usando MsCl/NEt₃ en CH₂Cl₂ se detectó el ácido **12**). Cuando se usaba el sistema N-hidroxisuccinimida/DCC como agente de

¹⁶ König, W., Giger, R.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 103, **1970**, 788

¹⁷ Anderson, G.W., Zimmerman, J.E., Callahan, M.F.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, **1964**, 1839-42

¹⁸ Wissner, A. Et al.; *J. Med. Chem.*, 35, **1995**, 4779-4789

¹⁹ Damn, W. et al.; *Tetrahedron*, 50,24, **1994**, 7029-7048

²⁰ Myers, A.G. et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, 119, **1997**, 6496-6511

²¹ Johnson, E.P., et al.; *Org. Procces Research & Development*, **1998**, 238-244

²² Comunicación interna

condensación se obtuvo un rendimiento de un 60 %, después de purificar mediante cromatografía sobre gel de sílice (superior al 47 % proporcionado por el sistema DCC/HBT).

No obstante, para favorecer el acoplamiento entre el intermedio **12a** y el aminoácido **9** así como para minimizar la presencia de DCU en el producto final, decidimos aislar, purificar y analizar dicho intermedio **12a**. Con este fin, la reacción entre el ácido **7**, la N-hidroxisuccinimida y la DCC en CHCl_3 , después de 4-5 h a temperatura ambiente se filtró para eliminar la DCU generada. El residuo se evaporó a sequedad, y el crudo obtenido se recrystalizó. Se probaron diferentes disolventes para la recrystalización como CH_2Cl_2 , AcOEt, y hexano. Con éste último disolvente se recrystalizó el intermedio **12a** con un rendimiento entre el 95-100 % y la cantidad de DCU detectada por $^1\text{H-RMN}$ era <10 %.

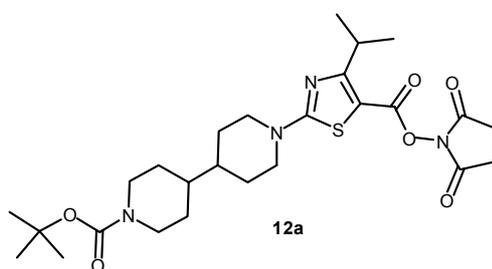


Figura 6

El primer paso de activación del ácido **7** había resultado cuantitativo, por lo tanto el acoplamiento entre la especie activada **12a** y el aminoácido **9** sería el que nos determinaría el rendimiento global de la condensación. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción (disolvente, base, temperatura y tiempo) para este proceso, y los resultados se resumen en la tabla 2.12:

Tabla 2.12

Entrada	Disolvente	Base	Cond.	Rdto.
1	DMF	NEt_3	18 h /t. a..	64 %
2	DMF	DIEA	18 h /t. a.	55 %
3	DMF	DIEA	4 h /50 °C.	±40 %
4	THF/ H_2O	DIEA	18 h /t. a.	±20 %
5	MeCN	DIEA	4 h /Reflujo	66 %

Los mejores rendimientos se obtuvieron cuando se realizaba la reacción en DMF y NEt_3 a temperatura ambiente durante 18 h (entrada 1) o en MeCN y DIEA 4 h a reflujo (entrada 5). Se optó por la segunda metódica, porque aunque los rendimientos

eran muy parecidos, la reacción era más limpia de subproductos y la purificación más sencilla (además siempre es un inconveniente evaporar la DMF por su alto punto de ebullición). No obstante, el producto **12** se obtuvo mediante purificación por cromatografía a través de gel de sílice. Si bien se intentaron diferentes condiciones de recristalización en diferentes disolventes (hexano, AcOEt, tolueno) como alternativa de purificación, no se obtuvo ningún resultado positivo y se decidió mantener esta columna.

El paso final de la síntesis consistía en la hidrólisis del grupo protector *tert*-butoxicarbonilo, que como habíamos comprobado en la primera síntesis del **UR-12947** se eliminaba con facilidad en condiciones ácidas, como HCl 3N/THF. Cuando ensayamos estas condiciones con los primeros lotes del ácido **12**, confirmamos que efectivamente dicho grupo protector era eliminado cuantitativamente y era una reacción mucho más limpia (por CCF, por ¹H-RMN, y por HPLC) que la anterior hidrólisis del intermedio **11**. Los problemas se daban durante el aislamiento del producto final para alcanzar las especificaciones de pureza exigida para los lotes de **UR-12947**, que eran las siguientes:

- Pureza por HPLC >97 %
- Impurezas orgánicas totales (por HPLC) : 3 % (cada una no más del 1%)
- Residuo inorgánico < 0,2 %
- Exceso enantiomérico > 98

Conjuntamente con el Departamento de Análisis de J. Uriach & Cía se pusieron a punto los métodos analíticos (ver Parte Experimental) para asegurar que los lotes finales cumplieran estos requerimientos.

Así pues, el ácido **12** después de estar 18 h a temperatura ambiente en una mezcla HCl 3N/THF se trató en primer lugar evaporando a sequedad. El residuo se redisolvió en H₂O y a pH ácido se extrajo con AcOEt tres veces (para eliminar subproductos neutros o ácidos). La fase acuosa se neutralizó con NaOH 2N y se formó una pasta insoluble. Con el fin de deshacer esta pasta, facilitar la precipitación del **UR-12947**, y a la vez conseguir una nueva purificación, añadimos un cosolvente orgánico (que podía disolver impurezas orgánicas) que no disolviese el **UR-12947**. El producto filtrado se analizaba por HPLC. Se probaron las siguientes condiciones:

Tabla 2.13

Entrada	Cosolvente	Temperatura	Tiempo	HPLC
1	AcOEt	4 °C	18 h	> 15 % impurezas
2	AcOEt	0-4 °C	10 min	1,4 % impurezas
3	Acetona	0-4 °C	30 min	<0,1 % impurezas (recristalizado)

En estas pruebas vimos que cuando se mantenía la disolución en la nevera (4 °C) durante 18 h (entrada 1) coprecipitaban un gran número de impurezas. No obstante este crudo se utilizó para ensayar condiciones de recristalización y se purificó en una mezcla AcOH/H₂O, obteniéndose un lote de **UR-12947** con unas impurezas totales del 1,5 % (si bien no cumplió las especificaciones porque una de ellas era del 1,2 %). El lote de **UR-12947** obtenido por precipitación en AcOEt/H₂O durante 10 min a 0-4 °C (entrada 2) cumplía las exigencias analíticas, con un rendimiento del 80%, pero resultó ser no reproducible. Algunos lotes, no obstante se recristalizaron en AcOH/EtOH y se obtuvo un lote final con una pureza según nuestros métodos analíticos >99,9 %. El sólido obtenido en la entrada 3 se recristalizó directamente en isopropanol/H₂O y se obtuvo una pureza también >99,9 % pero con un 34 % de rendimiento.

Paralelamente realizamos una operación en la que no añadíamos ningún cosolvente, simplemente agitábamos la solución acuosa 30 min a 50 °C y la pasta se convertía en un sólido blanco. A continuación filtramos el sólido, se lavó con acetona, y se obtuvo un lote de **UR-12947** con unas impurezas totales del 1,2 % y que cumplía todas las exigencias analíticas. El rendimiento era del 67 %.

Consideramos estas últimas condiciones como las más adecuadas, ya que al escalar la operación fue la que dio unos resultados más reproducibles tanto en rendimiento como en exigencias analíticas.

En este punto consideramos la síntesis del **UR-12947** suficientemente mejorada para ser ensayada en planta piloto. La única purificación por cromatografía que no habíamos eliminado, del producto **12**, fue sustituida posteriormente a este trabajo por una recristalización en CHCl₃.

2.8.3 Pureza Óptica del UR-12947

Un aspecto muy importante en la síntesis del **UR-12947** era que el centro quiral se conservara inalterado durante el proceso sintético y por lo tanto que cumpliera las especificaciones de riqueza óptica exigidas. Con el fin de poner a punto un método analítico capaz de determinar el exceso enantiomérico del **UR-12947** obtenido en cada lote, se sintetizó el **UR-13015** (figura 7), compuesto enantiómero del **UR-12947**.

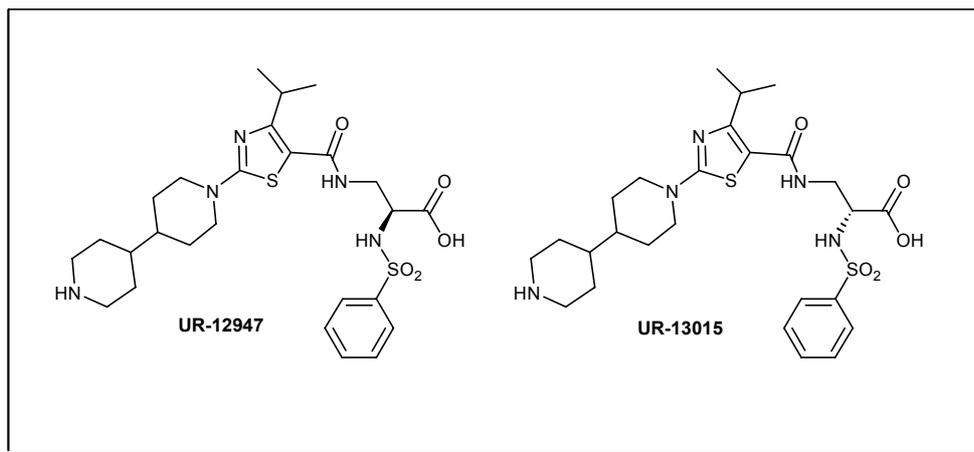


Figura 7

La síntesis del **UR-13015** se llevó a cabo a partir de la D-asparagina en lugar de la L-asparagina y siguiendo exactamente la misma metodología optimizada empleada para la obtención del **UR-12947** con unos rendimientos muy similares.

Se intentó la separación de los enantiómeros mediante HPLC con diferentes columnas quirales en el centro de Química Fina Urquima S.A. Concretamente se emplearon las siguientes columnas:

- OA-5000L
- QUIRALPAK AD
- CYCLOBOND I™ (β -Cyclodextrin)
- NUCLEOSIL-QUIRAL 2

En ningún caso se consiguió la separación que nos habíamos propuesto.

Con estos dos compuestos, la *Unitat de Recerca en Síntesi Asimètrica* de la Universidad de Barcelona intentó su separación cromatográfica en dos columnas quirales de HPLC: **Chiralcel OD** (fase normal) y **Chiralcel OD** (fase reversa) en diferentes condiciones de elución. La conclusión fue que tampoco se encontró un método útil de separación.

En el Departamento de Análisis de J. Uriach & Cía, se decidió probar esta separación utilizando la técnica analítica de Electroforesis Capilar Quiral (ECQ).²³ Esta técnica de separación se basa en las diferencias entre las propiedades eléctricas de los analitos, es decir las especies cargadas se separan en un medio conductivo en función de su distinta velocidad de migración al aplicar un campo eléctrico. En general el medio conductivo suele ser una solución tampón. Como las sustancias enantiómeras no presentan diferencias de carga, su movilidad electroforética será la misma y no habrá separación. Para conseguir esta separación, el medio conductivo ha de contener selectores (o aditivos) quirales capaces de interaccionar estereoselectivamente con ambos enantiómeros, es decir con diferentes constantes de unión aditivo-enantiómero. Gracias a esta interacción, las velocidades de migración serán diferentes y se podrá conseguir la separación quiral (figura 8). Así pues, mientras que en HPLC quiral el éxito de la separación dependía de la columna quiral en ECQ dependerá del aditivo quiral básicamente.

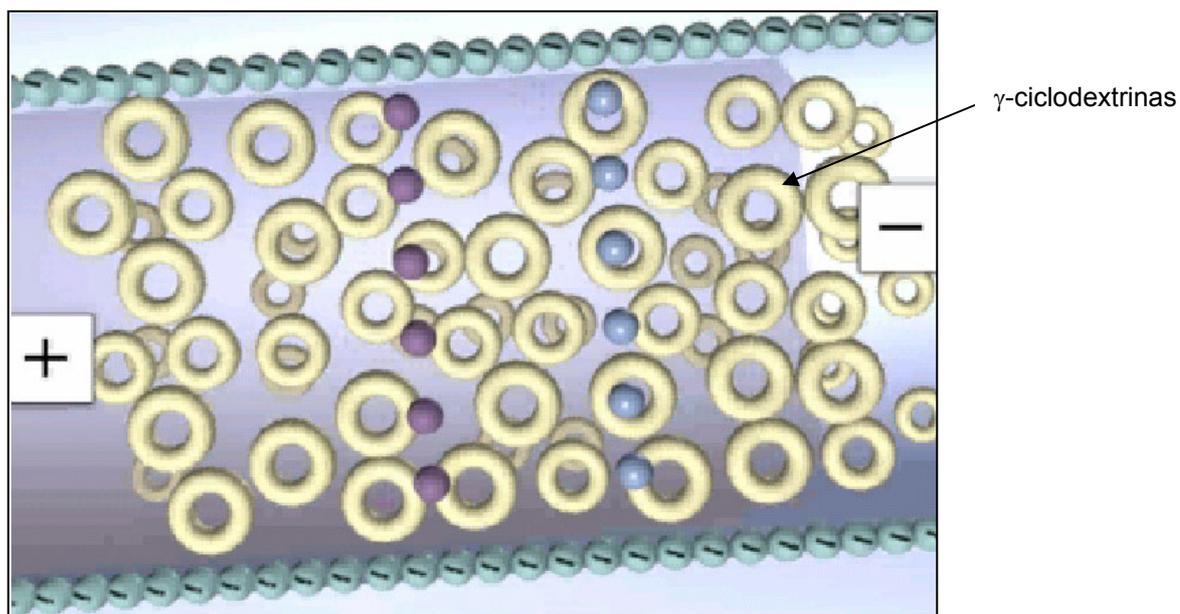


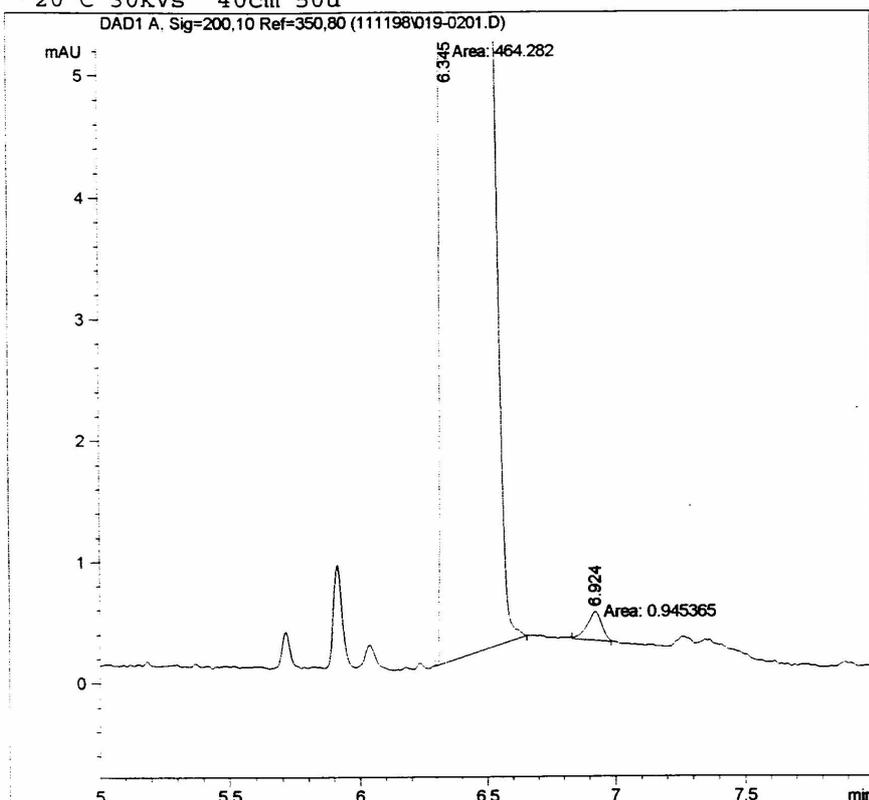
Figura 8

Nuestro equipo de análisis decidió usar γ -ciclodextrinas (Aldrich) como aditivo quiral para obtener la separación deseada y el aparato de Electroforesis Capilar Modelo 3D EC de Hewlett Packard. En la Parte Experimental de este capítulo se detallan las condiciones experimentales de esta metodología.

²³ Bezham Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, 1997

El resultado del empleo de esta técnica analítica fue espectacular y se consiguió una separación excelente. Los cromatogramas y los resultados de esta separación son los que se exponen a continuación

```
=====
Injection Date   : 11/11/98 3:37:28 PM           Seq. Line :    2
Sample Name     : UR-12947 LIN-2                 Vial       :   19
Acq. Operator   : Jordi+Viki                     Inj        :    1
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\G-CD5V5.M
Last changed    : 10/16/98 10:00:58 AM by Judith+Viki
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\GCDSV5RE.M
Last changed    : 11/12/98 1:07:15 PM by Jordi+Viki
                  (modified after loading)
Tampo 50mM fosfat pH=2.5 + Gamma-CD 5mM
 20°C 30kVs 40cm 50u
=====
```



```
=====
Normalized Percent Report
=====
```

```
Sorted By           :      Signal
Area Calculation Mode :      Measured Area
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000
```

```
Signal 1: DAD1 A, Sig=200,10 Ref=350,80
=====
```

```
=====  
                          Area Percent Report  
=====
```

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=200,10 Ref=350,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.345	MM	0.1233	464.28204	62.75602	99.7968
2	6.924	MM	0.0664	9.45365e-1	2.37466e-1	0.2032

Totals : 465.22741 62.99348

El resultado es que el enantiómero **UR-13015**, que presenta un $t_r=6,9$, tan solo impurifica a nuestro **UR-12947** ($t_r=6,3$) en un 0,2 %, por lo tanto los lotes finales están dentro de las especificaciones requeridas, y hemos comprobado que no se produce racemización durante la síntesis del **UR-12947**.

3. CONCLUSIONES

Se ha realizado la optimización de la síntesis del **UR-12947** como paso previo a su obtención en Planta Piloto. Si bien el esquema sintético no se ha modificado sustancialmente, si se han optimizado todas las reacciones necesarias para preparar el **UR-12947**.

Para la síntesis del intermedio **2** a partir del dihidrocloruro de la 4,4'-bipiperidina, se han mejorado las condiciones experimentales de pH, temperatura, tiempo de reacción, disolvente, base, y equivalentes de reactivos de tal forma que se ha conseguido un rendimiento final del 75 % así como minimizar la formación del subproducto **2a**, lo cual se preveía difícil al ser simétrico el compuesto de partida.

El compuesto **3**, que en la primera síntesis se obtenía como crudo (y era la causa de bajos rendimientos posteriores) se ha obtenido prácticamente puro y con un rendimiento superior al 80 %, después de sustituir el reactivo comercial isotiocianato de carboxietilo por su generación *in situ*.

Se han estudiado las condiciones de reacción y de aislamiento de la tiourea **4**, de tal forma que el compuesto pretendido se ha preparado con un excelente rendimiento (80 %), y sin impurezas orgánicas ni inorgánicas. No obstante, no se ha conseguido preparar el compuesto **4** directamente a partir de **2**.

El tiazol **6** se ha preparado y aislado con una elevada eficacia. Se ha evitado la desprotección del grupo Boc, principal inconveniente de la síntesis inicial. Esto se ha conseguido utilizando un disolvente de reacción como el CH₂Cl₂, capaz de solubilizar todas las especies presentes sin necesidad de subir la temperatura por encima de 50 °C. Finalmente el crudo se purificó recristalizando en hexano.

Se ha optimizado el tratamiento del compuesto **7**, de tal manera que se ha aislado prácticamente sin sales inorgánicas, que era el problema que presentaba este intermedio. Para ello se han variado las condiciones de pH, temperatura y se ha introducido un cosolvente que ayude a la precipitación del producto deseado.

La obtención inicial del **UR-12947** a partir del tiazol **7** y la amina **10** se ha sustituido por el acoplamiento entre dicho tiazol y el aminoácido **9**. Con ello hemos logrado excelentes resultados, ya que además de conseguir este acoplamiento con elevado rendimiento, se ha eliminado un paso sintético, la hidrólisis del éster metílico que requería condiciones de reacción muy enérgicas. Si bien la cromatografía en columna del ácido **12** no se consiguió eliminar, posteriormente fue sustituida por una recristalización en CHCl₃.

El **UR-12947** se ha obtenido a partir del precursor **12** mediante una hidrólisis suave en HCl 3N. Este compuesto se aisló con la pureza necesaria para cumplir todas las especificaciones requeridas y con un rendimiento superior al 60 %.

Finalmente, juntamente con el Departamento de Análisis, se han puesto a punto las técnicas analíticas necesarias para comprobar que los diferentes lotes de **UR-12947** cumplen todas las especificaciones exigidas. Especialmente difícil fue asegurar la pureza óptica del **UR-12947**, obtenido después de haber introducido todas las variaciones descritas. Con este propósito se sintetizó el enantiómero **UR-13015** y se ensayaron diferentes condiciones de análisis mediante HPLC Quiral. No se tuvo éxito con este análisis. Se desarrolló un método de Electroforesis Capilar Quiral (ECQ) con γ -ciclodextrinas y el resultado fue una separación excelente de los enantiómeros. Con este análisis podemos afirmar que no existe racemización y que nuestro producto cumple las exigencias de pureza óptica exigidas.