

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 825**

51 Int. Cl.:

C07C 269/04 (2006.01)

C07C 269/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2016** **PCT/EP2016/077353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017** **WO17081206**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2016** **E 16795304 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.01.2022** **EP 3374345**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de oxazolinas diastereomérica y enantioméricamente enriquecidas**

30 Prioridad:

11.11.2015 EP 15382562

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

10.05.2022

73 Titular/es:

QUÍMICA SINTÉTICA, S.A. (100.0%)
c/ Dulcinea s/n
28805 Alcalá de Henares, Madrid, ES

72 Inventor/es:

BARRECA, GIUSEPPE;
RASPARINI, MARCELLO;
CARCONE, LUCA y
MORANA, FABIO

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 909 825 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

Procedimientos para la preparación de oxazolinas diastereomérica y enantioméricamente enriquecidas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente europea EP15382562.5 presentada el 11 de noviembre de 2015.

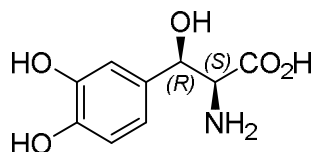
CAMPO DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere a un procedimiento industrialmente factible y ventajoso para la preparación de ácido
10 (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-3-hidroxiopropanoico, generalmente conocido como Droxidopa, o de intermedios útiles en la síntesis del mismo.

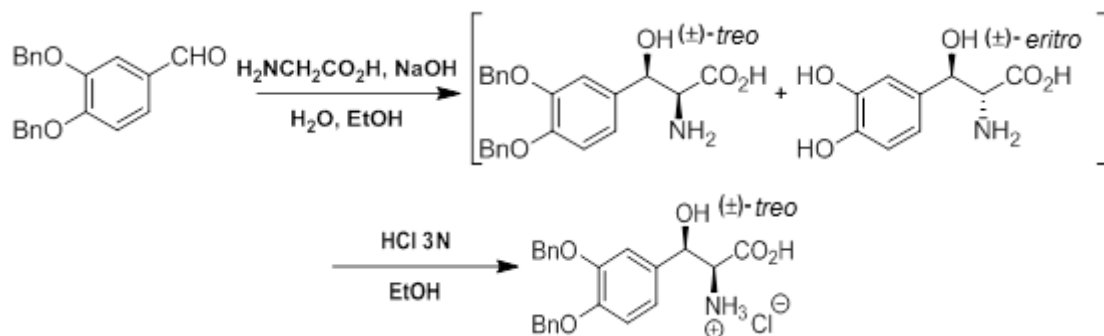
TÉCNICA ANTERIOR

- El ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-3-hidroxiopropanoico, conocido también como L-treo-
15 dihidroxifenilserina, L-treo-DOPS, L-DOPS o Droxidopa, es un precursor sintético oralmente activo de la norepinefrina. El Droxidopa repone la norepinefrina agotada, permitiendo la recaptación de norepinefrina en las neuronas del sistema nervioso periférico. Esta recaptación, a su vez estimula los receptores para la vasoconstricción, proporcionando una mejora fisiológica en los pacientes con hipotensión ortostática neurogénica sintomática. Ha mostrado también eficacia en otras enfermedades tales como enfermedad de Parkinson y depresión.
20 Se ha usado Droxidopa en Japón durante muchos años para el tratamiento de la hipotensión ortostática. Se aprobó originalmente en 1989 para el tratamiento de marcha congelada o mareo asociado con la enfermedad de Parkinson para el tratamiento de la hipotensión ortostática, síncope o mareo asociado con el síndrome de Shy-Drager y polineuropatía amiloidiopática familiar.
La aprobación para el mercado se amplió posteriormente para incluir el tratamiento de vértigo, mareo y debilidad
25 asociados con la hipotensión ortostática en pacientes de hemodiálisis.

El Droxidopa tiene la siguiente estructura química:



- Su preparación química generalmente implica una síntesis multi-etapa. Típicamente, una o más de las etapas
30 necesarias en la síntesis requieren que los sitios reactivos, distintos del sitio destinado para la reacción, se protejan temporalmente. De esta manera, la síntesis de Droxidopa típicamente comprende al menos una etapa de protección y desprotección asociadas. Por ejemplo, el resto catecol, el resto amina y/o el resto carboxilo pueden requerir protección y posterior desprotección, dependiendo de la ruta de síntesis y de los reactivos usados en la preparación de Droxidopa.
35 Se han descrito en la bibliografía diversos enfoques sintéticos y enzimáticos para Droxidopa. La mayoría de ellos suponen el acoplamiento entre un 3,4-dihidroxi benzaldehído protegido convencionalmente con glicina para producir una mezcla diastereoméricamente enriquecida de treo-DOPS. Este enfoque, descrito por Microbiochemical Research Foundation en la patente EP 0112606 B1, no es estereoselectivo y depende de cristalizaciones fraccionadas para separar una mezcla *treo/eritro*.
40



- Los grupos protectores adecuados para los restos hidroxilo de 3,4-dihidroxi benzaldehído son éteres (por ejemplo
45 bencilo y metilo) o acetales cíclicos (por ejemplo metilen acetal). La retirada de acetales cíclicos o éteres de metilo requiere el tratamiento con un ácido de Lewis (por ejemplo AlCl_3) y un tiol (por ejemplo etanotiol, un compuesto volátil con un olor extremadamente repulsivo). Al contrario, la retirada de éteres de bencilo puede conseguirse mediante una hidrogenólisis sencilla, limpia y cuantitativa.

La mezcla diastereoméricamente enriquecida de *treo*-DOPS protegido puede convertirse en el D- y L-*treo*-DOPS ópticamente activo resolviendo ópticamente una mezcla racémica de *treo*-2-(3,4-metilenedioxifenil)-*N*-carbobenciloxiserina o *treo*-2-(3,4-dibenciloxi-fenil)-*N*-carbobenciloxiserina, como se detalla en las patentes US 4.319.040 y US 4.480.109, respectivamente. Después de la resolución óptica de estas mezclas racémicas para dar el enantiómero L deseado, los grupos metilendioxi o bencilo deben retirarse del resto catecol y el grupo carbobenciloxi (Cbz) debe retirarse del grupo amina para dar Droxidopa.

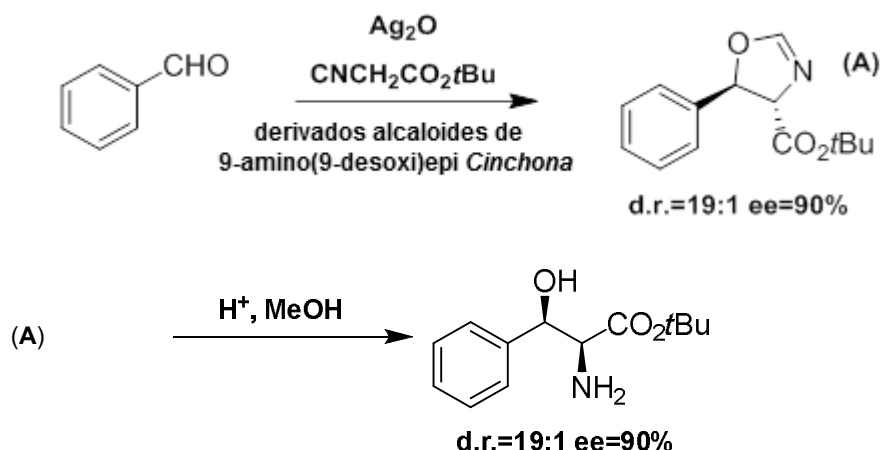
De acuerdo con un enfoque alternativo descrito en la patente EP 201039 B1, una mezcla racémica de *treo*-2-(3,4-dibenciloxi-fenil)-*N*-acetilserina can puede convertirse en L-*treo*-2-(3,4-dibenciloxi-fenil)-serina por tratamiento con L-amino acilasa.

Una desventaja asociada con todas las rutas sintéticas citadas anteriormente es que al convertir un material de partida racémico usando una enzima enantioselectiva o una amina ópticamente activa, puede conseguirse un rendimiento máximo del 50 % del producto final enantioméricamente puro.

Un procedimiento alternativo para la preparación estereoselectiva de Droxidopa se ha descrito en la patente EP 375554 B1. De acuerdo con esta última, los dos estereocentros se introducen simultáneamente con hidrogenación asimétrica de tipo Noyori con resolución cinética dinámica (AH-DKR). El procedimiento es particularmente interesante porque se cataliza por el más barato de los metales de transición (rutenio) y de las fosfinas quirales (Binap) empleadas en las hidrogenaciones asimétricas. Sin embargo, las condiciones propuestas no son adecuadas para una producción industrial de Droxidopa, porque: 100 bar de presión de hidrógeno está fuera del alcance en las vasijas industriales normales; el tiempo de reacción presentado es poco práctico (casi 1 semana); el mejor disolvente es diclorometano (que debería evitarse por cuestiones medioambientales); y la desprotección del resto metilendioxi requiere un gran exceso de AlCl_3 o AlBr_3 .

En la patente JP 5028850 se ha descrito un enfoque enzimático estereoselectivo para Droxidopa y supone el acoplamiento de glicina o una sal de la misma con 3,4-dihidroxibenzaldehído en presencia de una treonina aldolasa para formar el derivado de aminoácido enantioméricamente enriquecido correspondiente.

Un enfoque sintético innovador para la preparación de oxazolinas diastereomérica y enantioméricamente enriquecidas (**A**) (por reacción de isocianoacetatos con aldehídos en presencia de derivados del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* y una sal de plata u oro) se ha descrito en el *Journal of the American Chemical Society* (2011), 133, 1710-1713.

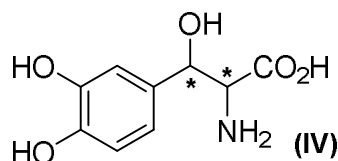


Dichas oxazolinas (**A**) pueden convertirse adicionalmente en los ésteres de *terc*-butilo correspondientes por hidrólisis.

El objetivo de esta invención es proporcionar un método químico para preparar Droxidopa o intermedios útiles en la síntesis del mismo, caracterizado por altos rendimientos y niveles de estereocontrol evitando el uso de reactivos peligrosos y proporcionando los compuestos deseados con una pureza apropiada para su uso en compuestos farmacéuticos.

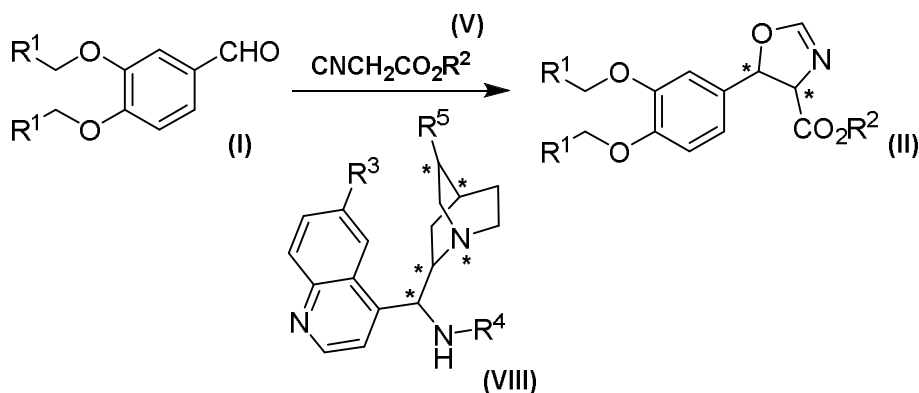
SUMARIO DE LA INVENCION

Estos objetivos se consiguieron con la presente invención que, en un primer aspecto de la misma, se refiere a un procedimiento para la preparación de una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura de un aminoácido de fórmula general (**IV**) o una sal del mismo:



comprendiendo dicho procedimiento las siguientes operaciones sintéticas:

a) preparar una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) haciendo reaccionar un benzaldehído (I) con un isocianoacetato (V) en presencia de un sistema catalítico que comprende un derivado del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* (VIII) y una sal de plata u oro, o una mezcla de las mismas:

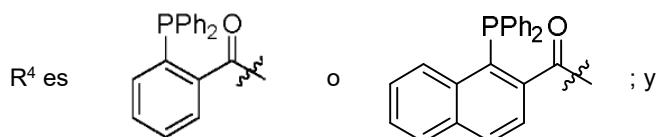


5

donde R^1 es un arilo C6-C10 o un arilo C6-C10 sustituido (por ejemplo fenilo);

R^2 es un alquilo C1-C6 lineal o ramificado (por ejemplo metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo o *terc*-butilo), un arilo C6-C10 (por ejemplo fenilo) o un alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido con un arilo C6-C10 (por ejemplo bencilo);

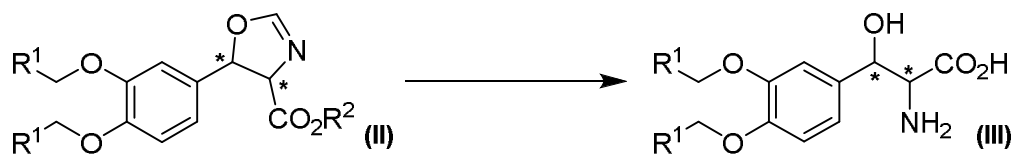
10 R^3 es H, OH, o un alcoxi C1-C6 lineal o ramificado (por ejemplo metoxi);



R^5 es un etilo o un grupo vinilo.

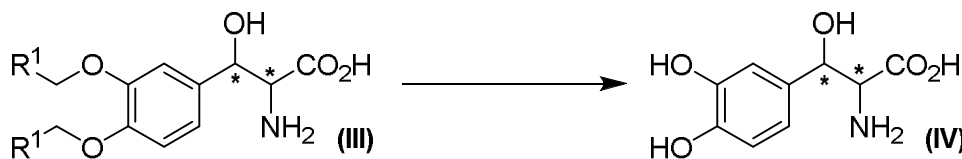
b) convertir dicha mezcla enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III):

15



c) convertir la mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV):

20



DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Todos los términos usados en la presente solicitud, a menos que se indique de otra manera, deben interpretarse en su significado ordinario como se conoce en el campo técnico. Se dan a continuación otras definiciones más específicas de algunos términos usados en la presente solicitud y pretenden aplicarse uniformemente a toda la descripción y las reivindicaciones, a menos que se indique de otra manera.

En general, la nomenclatura usada en esta Solicitud está basada en AUTONOM™ v.4.0, un sistema informatizado del Instituto Beilstein para la generación de nomenclatura sistemática IUPAC. Si hay alguna discrepancia entre una estructura representada y un nombre dado respecto a la estructura, debe considerarse correcta la estructura representada. Adicionalmente, si no se indica la estereoquímica de una estructura o una porción de una estructura no, por ejemplo con líneas en negrita o discontinuas, la estructura o porción de la estructura tiene que interpretarse como que abarca todos los estereoisómeros existentes de la misma.

Los compuestos preparados por el procedimiento de la presente invención pueden tener uno o más centros estereogénicos y pueden existir y pueden usarse o aislarse en formas enantioméricamente puras, como formas enantioméricamente enriquecidas así como en formas diastereoméricamente puras o como mezclas

diastereoméricamente enriquecidas. Debe entenderse que los procedimientos de la presente invención pueden dar lugar a cualquiera de las formas previas o una combinación de las mismas. Debe entenderse también que los productos de los procedimientos descritos en la presente memoria pueden aislarse como formas enantiomérica y diastereoméricamente puras o como mezclas enantiomérica y diastereoméricamente enriquecidas.

- 5 El signo "*" (asterisco) presente en algunas fórmulas de esta descripción indica un centro estereogénico (asimétrico) aunque la ausencia de asteriscos no necesariamente implica que el compuesto carezca de un estereocentro. Tales fórmulas pueden hacer referencia a un racemato o a enantiómeros o diastereómeros individuales, que pueden ser o no sustancialmente puros.

Una mezcla de enantiómeros (*R,S*) puede contener los dos enantiómeros individuales en cualquier relación entre sí.

- 10 La pureza enantiomérica generalmente se expresa como "exceso enantiomérico" o *ee* y se define, por ejemplo para el enantiómero (*S*) como $[(S-R)/(R+S)] \times 100$, en la que *S* y *R* son respectivamente las cantidades de los enantiómeros (*S*) y (*R*) (según se determina por ejemplo por GC o HPLC en una fase estacionaria quiral o polarimetría). El término "arilo" se refiere a cualquier sustituyente derivado de un hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico por retirada de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono del anillo (es decir, fenilo, toliilo, 1-naftilo o 2-naftilo).

- 15 El término "racémico" se refiere a una muestra de un compuesto quiral que contiene ambos isómeros (+) y (-) en cantidades iguales.

La expresión "enantioméricamente enriquecido" como se usa en la presente memoria significa que uno de los enantiómeros de un compuesto está presente en exceso en comparación con el otro enantiómero.

- La expresión "enantioméricamente puro" como se usa en la presente memoria significa que la pureza enantiomérica normalmente es al menos aproximadamente un 96 %, preferentemente al menos un 99 %, más preferentemente al menos un 99,5 %.

La expresión "diastereoméricamente enriquecido" como se usa en la presente memoria significa que uno de los diastereómeros de un compuesto está presente en exceso en comparación con el otro diastereómero.

- La expresión "diastereoméricamente pura" como se usa en la presente memoria significa que la pureza diastereomérica normalmente es al menos aproximadamente un 96 %, preferentemente al menos un 99 %, más preferentemente al menos un 99,5 %.

El símbolo "⏟" (enlaces de guiones) presente en algunas de las fórmulas de la descripción y las reivindicaciones indica que el sustituyente se dirige hacia abajo del plano de la hoja.

- El símbolo "⏟" (enlace cuña) presente en algunas de las fórmulas de la descripción y las reivindicaciones indica que el sustituyente se dirige hacia arriba del plano de la hoja.

Los compuestos obtenidos por las transformaciones químicas de la presente invención pueden usarse para las siguientes etapas sin purificación adicional o pueden separarse y purificarse empleando métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia, tales como recristalización, cromatografía en columna o por transformación de los mismos en una sal o un co-cristal con un co-formador apropiado o lavándose con un disolvente orgánico o con

- 35 una solución acuosa, opcionalmente ajustando el pH.

Se entenderá que cualquier compuesto descrito en la presente memoria puede describirse en cualquiera de las sales o co-cristales del mismo.

El término "semilla" se refiere a una sustancia cristalina que se añade a una solución de la misma sustancia para inducir su cristalización. La siembra con un isómero óptico específico a menudo tiene el efecto útil de promover la

- 40 cristalización de la sustancia en la misma forma de la semilla.

Debe observarse que, durante la conversión de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) en la mezcla enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV), no se observa ni la epimerización (es decir, la pérdida de diastereoselectividad hacia el isómero *eritro*) ni la racemización (conversión del enantiómero principal hacia el minoritario conduciendo a un menor *ee*). Por consiguiente, la d.r. (relación diastereomérica, en concreto la relación del porcentaje de un diastereoisómero en una mezcla al del otro diastereoisómero) y el *ee* detectados en la mezcla enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) permanecen sin cambios en la mezcla enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV).

- De acuerdo con su aspecto más general, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de un aminoácido de fórmula general (IV) o sales del mismo.

La primera operación del procedimiento de la invención a), consiste en la preparación de una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) mediante una reacción de aldol, en la que se hace reaccionar un benzaldehído (I) con un isocianoacetato (V) en presencia de un sistema catalítico que comprende un derivado del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* (VIII) y una sal de plata u oro o una mezcla de las mismas.

- Los benzaldehídos (I) y los isocianoacetatos (V) usados como reactivos en esta operación están disponibles en el mercado; como alternativa pueden prepararse de acuerdo técnicas convencionales en síntesis orgánica; en particular, los isocianoacetatos (V) pueden prepararse de acuerdo con la operación d) descrita a continuación.

Dicha reacción de aldol normalmente se lleva a cabo a temperaturas entre -40 y 80 °C, preferentemente entre -20 y

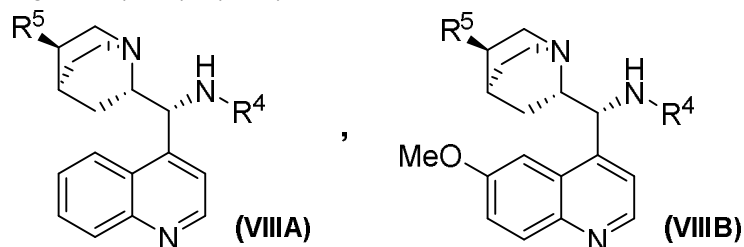
- 60 60 °C, por ejemplo entre 10 y 30 °C, en un disolvente polar aprótico tal como un éter (preferentemente tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, metil-*tert*-butil éter o ciclopentilmetil éter), un acetato (preferentemente acetato de etilo o *iso*-propilacetato), acetonitrilo, un disolvente clorado (tal como diclorometano) o una mezcla de los mismos.

Las sales de plata u oro adecuadas para este fin son, por ejemplo, acetato de plata, carbonato de plata, óxido de plata, cloro(trifenilfosfina)oro o una mezcla de las mismas.

Los derivados del alcaloide *Cinchona* (VIII) útiles para la invención pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento descrito en *Nature Protocols* (2013), 8, 325-344 y *Journal of the American Chemical Society* (2011), 133, 1710-1713 partiendo de cinchonidina, cinchonina, quinina o quinidina disponibles en el mercado (normalmente comercializadas como una mezcla de los derivados insaturados/saturados).

De acuerdo con una realización alternativa del procedimiento objeto del aspecto más general de la presente invención, dicha mezcla insaturada/saturada se convierte en una mezcla de derivados del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* insaturado/saturado que se usa tal cual en la reacción de aldol de la operación a).

- 10 Preferentemente, el derivado del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* (VIII) usado en la operación a) se caracteriza por la fórmula general (VIII A) o (VIII B):



donde R4 y R5 tienen los significados dados anteriormente.

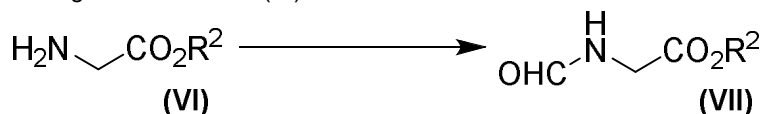
- La cantidad de isocianoacetato (V) normalmente está entre 1 y 1,5 equivalentes, preferentemente entre 1,05 y 1,1 equivalentes, con respecto a la cantidad de benzaldehído (I) usado.

La cantidad molar de derivado del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* normalmente está entre 1/200 y 1/20 con respecto a la cantidad de benzaldehído de fórmula general (I) usado, por ejemplo entre 1/100 y 1/50.

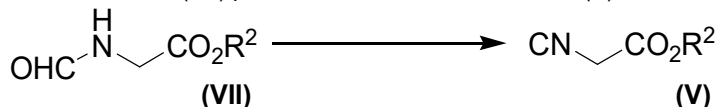
La cantidad molar de la sal de plata u oro o de la mezcla de las mismas con respecto al derivado del alcaloide 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* en el sistema catalítico normalmente está entre 1:1 y 1:8 (mol/mol).

- 20 Los isocianoacetatos (V) para su uso en la operación a) pueden prepararse en una operación d), que comprende las siguientes etapas:

d.1) convertir un derivado de glicina de fórmula (VI) o una sal del mismo en el derivado *N*-formilo correspondiente (VII):



d.2) deshidratar dicho derivado *N*-formilo (VII) para obtener un isocianoacetato (V):



- 25 donde R² es un alquilo C1-C6 lineal o ramificado (por ejemplo metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo), un arilo C6-C10 (por ejemplo fenilo), o un alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido con un arilo C6-C10 (por ejemplo bencilo).

- La etapa d.1) incluye el tratamiento de un derivado de glicina de fórmula (VI) o una sal del mismo (preferentemente la sal clorhidrato) con un formiato, preferentemente formiato de etilo para obtener un derivado de *N*-formilo (VII). Cuando se usa una sal del derivado de glicina de fórmula (VI) como el compuesto de partida, las condiciones indicadas anteriormente requieren además la presencia de una base orgánica, tal como una amina terciaria, por ejemplo trietilamina, *N,N*-diisopropiletiamina, *N,N*-diisopropilmetilamina, *N*-metilmorfolina o *N,N*-díciclohexilmetilamina.

- La cantidad de formiato normalmente está entre 5 y 15 equivalentes, preferentemente entre 8 y 10 equivalentes, con respecto a la cantidad de derivado de glicina (VI) usado.

La cantidad de base orgánica normalmente está entre 1 y 1,5 equivalentes, preferentemente es de 1,1 equivalentes, con respecto a la cantidad de derivado de glicina (VI) usado.

La etapa d.2) supone la conversión del derivado de *N*-formilo (VII), opcionalmente aislado, en un isocianoacetato (V) por tratamiento con uno de los agentes de deshidratación generalmente conocidos en el campo tales como por

- 40 ejemplo:

- Bis(triclorometil) carbonato (trifosgeno) o triclorometil cloroformiato (difosgeno) en presencia de una base, tal como una de las aminas terciarias indicadas anteriormente para la realizar la etapa d.1);
- POCl₃ en presencia de una base tal como una de las aminas terciarias indicadas anteriormente para la realizar la etapa d.1);
- Cloruro de tosilo en presencia de una base tal como una de las aminas terciarias indicadas anteriormente para la realizar la etapa d.1);
- Cloruro de mesilo en presencia de una base tal como una de las aminas terciarias indicadas anteriormente para la realizar la etapa d.1);

- El reactivo de Burgess.

Preferentemente, la etapa d.2) se realiza por tratamiento con POCl_3 y trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina en un disolvente adecuado (preferentemente un disolvente clorado, por ejemplo diclorometano).

La cantidad de POCl_3 normalmente está entre 1 y 1,2 equivalentes, preferentemente entre 1,05 y 1,1 equivalentes, con respecto a la cantidad del derivado de *N*-formilo (VII) usado.

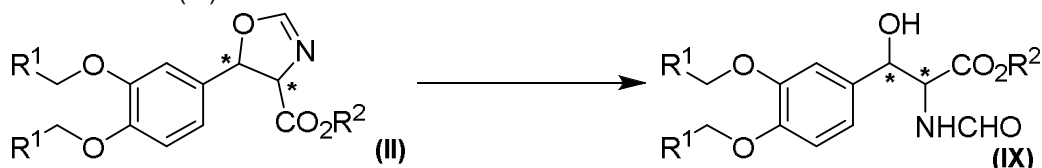
- 5 Las cantidades adecuadas de trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina normalmente son entre 2 y 5 equivalentes, preferentemente entre 2,2 y 2,5 equivalentes, con respecto a la cantidad del derivado de *N*-formilo (VII) usado.

De acuerdo con una realización aún más preferida de la presente invención, la solución resultante de la etapa d.2), que contiene el isocianoacetato (V), se usa tal cual en la reacción de aldol de la operación a).

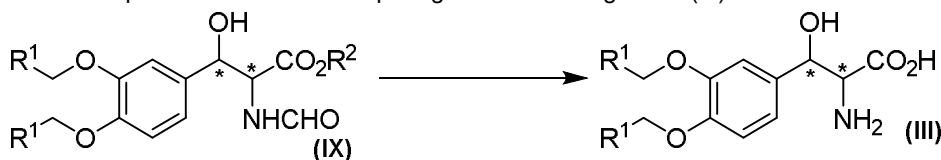
- 10 La operación b) del procedimiento de la invención comprende la conversión de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II), obtenida en la operación a), en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III). Esta operación incluye las siguientes etapas:

b.1) convertir la mezcla enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) en la mezcla enriquecida correspondiente

- 15 del derivado de *N*-formilo (IX):



b.2) convertir la mezcla enriquecida del derivado de *N*-formilo (IX) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III):



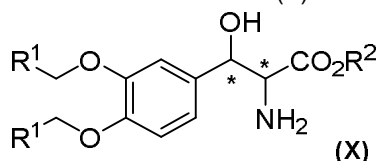
- 20 donde R^1 y R^2 tienen los significados dados anteriormente.

El objeto de transformación de la etapa b.1) supone la conversión de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II), opcionalmente aislada en la mezcla enriquecida correspondiente del derivado de *N*-formilo (IX) usando uno de los métodos generalmente conocidos en el campo, por ejemplo por tratamiento con un ácido. Las condiciones adecuadas comprenden, por ejemplo, el uso de una solución acuosa al 5 %

- 25 de ácido cítrico.

La mezcla enriquecida del derivado de *N*-formilo (IX) obtenido de esta manera, opcionalmente aislado, se somete adicionalmente, de acuerdo con la etapa b.2), a hidrólisis ácida para producir una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III). Las condiciones ácidas útiles para el fin se conocen en general en el campo e incluyen, por ejemplo, el tratamiento con ácido clorhídrico o una solución de cloruro de hidrógeno en un disolvente orgánico adecuado, tal como alcohol (por ejemplo metanol).

- 30 En el caso de que R^2 forme, junto con el grupo carboxilo al que está unido, un grupo éster no hidrolizable en las condiciones ácidas, por ejemplo un éster de metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, fenilo o bencilo, la hidrólisis ácida produce un compuesto *N*-desformilado de fórmula (X) a continuación:

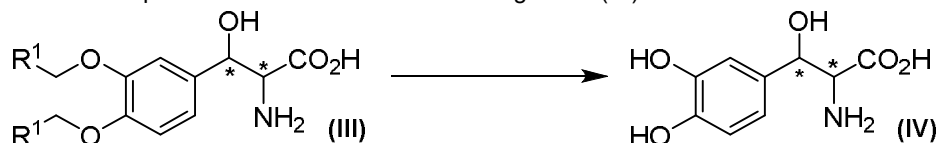


- 35 En este caso, la etapa b.2) incluye además la hidrólisis del resto éster con uno de los métodos conocidos por el experto. Preferentemente, dicha hidrólisis se realiza poniendo en contacto la mezcla enriquecida del derivado de *N*-formilo (IX) o el compuesto *N*-desformilado correspondiente de fórmula (X) con un hidróxido o un carbonato de un metal alcalino (tal como K_2CO_3 , Na_2CO_3 , Li_2CO_3 , Cs_2CO_3 , KOH, NaOH, LiOH) en un disolvente miscible en agua (por ejemplo metanol, etanol, tetrahidrofurano, dioxano o una mezcla de los mismos) en presencia de agua. La cantidad del hidróxido o carbonato del metal alcalino usado normalmente está entre 1 y 5 equivalentes, preferentemente 3 equivalentes, en comparación con la cantidad molar de cualquiera del derivado de *N*-formilo (IX) o el compuesto de fórmula (X) usado.

- 40 La siguiente operación del procedimiento de la invención, c), supone la conversión de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III), opcionalmente aislado, en la mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV). Esta operación puede realizarse de acuerdo con dos rutas de síntesis alternativas, c.i) y c.ii).

El esquema sintético c.i) incluye las siguientes etapas:

c.i.1) convertir la mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV):



donde R¹ tiene los significados dados anteriormente.

5 c.i.2) convertir la mezcla enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del mismo.

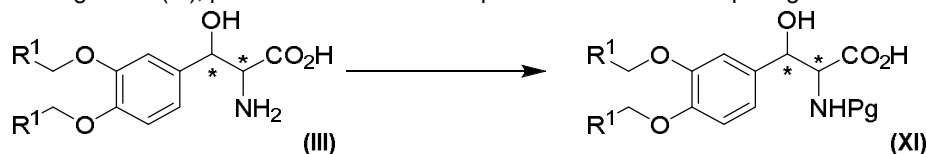
La etapa c.i.1) incluye la desprotección del resto catecol de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III). Esta etapa puede realizarse usando uno de los métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo uno de los descritos en Theodora W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons (1999), páginas 266-272. Por ejemplo, esta etapa puede llevarse a cabo por
10 tratamiento con hidrógeno en presencia de un catalizador (por ejemplo paladio, platino o níquel) opcionalmente soportado en un soporte apropiado, tal como carbono o carbonato de bario en un alcohol (preferentemente metanol o etanol) o una mezcla acuosa del mismo. Para promover la hidrogenólisis o mejorar la solubilidad del producto de reacción puede añadirse un ácido apropiado a la mezcla de reacción, preferentemente en una relación de 0,8 a 2,0
15 moles a 1,0 moles de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III). Los ácidos útiles para el objetivo son ácidos minerales (por ejemplo ácido clorhídrico o ácido sulfúrico) o ácidos orgánicos (tales como ácido acético o ácido metanosulfónico).

La etapa c.i.2) supone la conversión de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV) o una sal del mismo (preferentemente la sal clorhidrato) en una mezcla diastereomérica y
20 enantioméricamente pura del mismo por cristalización de una solución supersaturada de dicha mezcla enriquecida (IV) en agua o en una mezcla que comprende agua y un disolvente miscible en agua, tal como un alcohol (preferentemente metanol o etanol), una cetona (preferentemente acetona) o un éter (preferentemente dioxano o tetrahidrofurano). El volumen del disolvente normalmente está entre 50 ml y 80 ml por gramo de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV) usado; incluso más
25 preferentemente, dicho volumen está entre 60 y 70 ml por gramo de dicha mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida.

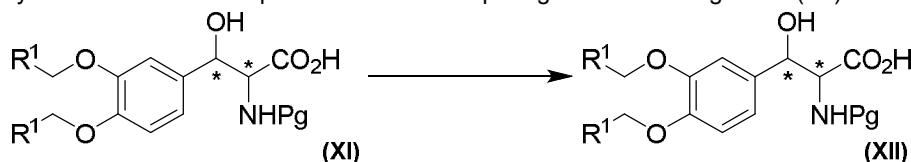
En una posible variante de esta operación, se añade una semilla del isómero ópticamente activo deseado a la solución supersaturada antes de enfriarla. La solución supersaturada de dicha mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida puede contener opcionalmente una base orgánica, tal como dimetilaminina, dimetilbencilamina o
30 trietilamina; una base inorgánica tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico; un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico; un ácido orgánico tal como ácido *para*-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico o ácido ascórbico; o un aminoácido tal como ácido D-, L- y D,L-aspartico o ácido D-, L- y D,L-glutámico. Cuando se usan, estas bases, ácidos o aminoácidos están presentes en una cantidad de 0,05 a 0,6 moles por mol de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV), para suprimir así la
35 cristalización del isómero no deseado y, de esta manera, aumentar la estabilidad de la solución supersaturada.

El esquema sintético alternativo c.ii) incluye las siguientes etapas:

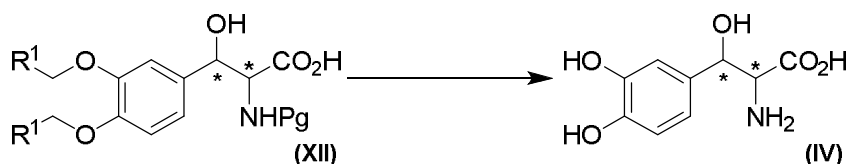
c.ii.1) proteger el grupo amino de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III), producir una mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI):



40 c.ii.2) convertir dicha mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI) en una forma diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido protegido de fórmula general (XII):



c.ii.3) convertir la mezcla pura del aminoácido protegido de fórmula general (XII) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV):



donde:

R¹ tiene los significados dados anteriormente; y

Pg es un grupo protector de nitrógeno, tal como *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) y benciloxicarbonilo (Cbz).

- 5 La etapa c.ii.1) incluye la protección del grupo amino de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III), opcionalmente aislado, de acuerdo con uno de los procedimientos descritos en Theodora W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons (1999), páginas 503-550. Preferentemente esta etapa se realiza tratando la mezcla (III) con di-*tert*-butildicarbonato (Boc₂O), cloroformiato de bencilo (CbzCl), *N*-(benciloxicarbonilo) succinimida (Cbz-OSu) o bicarbonato de dibencilo (Cbz₂O) en un
- 10 disolvente polar aprótico, tal como dimetilacetamida, dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetato de etilo, o en un disolvente clorado, tal como diclorometano, o una mezcla de los mismos, opcionalmente en presencia de una amina terciaria.

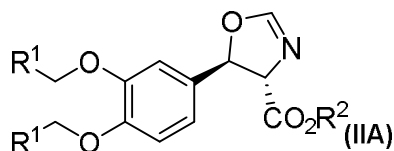
- La siguiente etapa c.ii.2) supone la conversión de la mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI), opcionalmente aislado, en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del mismo, (XII), por
- 15 tratamiento con una amina ópticamente activa (tal como (*S*)-2-amino-1,1-difenilpropanol) para obtener la sal correspondiente, seguido de la resolución de la sal diastereomérica de los dos enantiómeros del producto *treo* y el desbloqueo de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura por tratamiento con un ácido.

- La formación y fraccionamiento de la sal de amina generalmente se realizan por calentamiento a una temperatura cercana al punto de ebullición del disolvente usado, seguido de enfriamiento a una temperatura entre 0 y 30 °C. La
- 20 formación de la sal de amina se completa en algunos minutos pero el tiempo de reacción puede prolongarse hasta varias horas sin provocar ninguna alteración. La relación molar de amina ópticamente activa con respecto a la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI) es de 0,65 a 1. Los ejemplos de disolventes adecuados para la formación y fraccionamiento de las sales de amina son alcoholes (por ejemplo metanol, etanol y alcohol *iso*-propílico), éteres (tales como tetrahidrofurano y dioxano), acetonitrilo, agua y
- 25 mezclas de los mismos. En una posible variante del procedimiento, entre las etapas c.ii.2) y c.ii.3) se lleva a cabo una etapa adicional, c.ii.2'), en la que la sal con la amina ópticamente activa se suspende en un acetato (preferentemente acetato de *iso*-propilo), en acetonitrilo o una mezcla del mismo, para reducir la cantidad de impurezas residuales.

El ácido adecuado para descomponer la sal son ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. El ácido generalmente se usa en cantidades entre 1 y 10 moles por mol de sal de amina.

- 30 La etapa final, c.ii.3), supone la conversión de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido protegido de fórmula general (XII) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV). Esta operación puede realizarse usando uno de los métodos conocidos por el experto, por ejemplo uno de los descritos en Theodora W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons (1999), páginas 503-550. Preferentemente, cuando Pg es benciloxicarbonilo, dicha desprotección se realiza de
- 35 acuerdo con uno de los métodos descritos para la etapa operativa c.i.1). Cuando Pg es *tert*-butiloxicarbonilo, esta se puede llevar a cabo por tratamiento con ácido fosfórico, ácido trifluoroacético (TFA), una solución de cloruro de hidrógeno en agua o en un disolvente orgánico o por tratamiento con ácido fórmico.

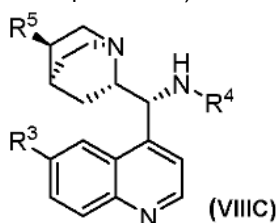
- Preferentemente la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) preparada en la operación a) del procedimiento es una *trans*-oxazolina enantioméricamente enriquecida de fórmula
- 40 general (IIA):



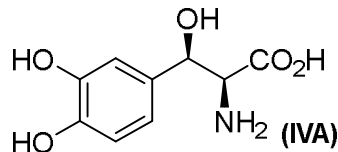
mezcla *trans*-enantioméricamente enriquecida

El compuesto IIA se obtiene llevando a cabo el proceso definido anteriormente, en el que el derivado del alcaloide 9-amino(9-deoxi)epi Cinchona (VIII) utilizado en la operación a) se caracteriza por la fórmula general (VIIIc)

45



en la que R³, R⁴ and R⁵ se definen como anteriormente. En este caso, el procedimiento conduce a la formación de un *treo*-aminoácido enantioméricamente puro de fórmula general (IVA):



mezcla *treo*-enantioméricamente purificada

5

En particular, el derivado del alcaloide 9-amino(9-deoxi)epi Cinchona de fórmula (VIIC) utilizado en la operación a) se caracteriza por la fórmula general (VIIIA) o (VIIIB) como se ha definido anteriormente.

La mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV) obtenida por el procedimiento objeto de la presente invención puede convertirse en una sal o un co-cristal de la misma en una etapa

10

opcional adicional. Cuando la mezcla pura del aminoácido de fórmula general (IV), o cualquier otro de los compuestos descritos en la presente solicitud se obtiene con un grado de pureza química no adecuado para la inclusión en un medicamento, el procedimiento objeto de la presente invención implica una etapa adicional de purificación, por ejemplo mediante cromatografía o cristalización, opcionalmente después de la formación de un compuesto de adición, tal como por

15

ejemplo una sal o un co-cristal o por lavado con un disolvente orgánico o una solución acuosa, opcionalmente ajustando el pH.

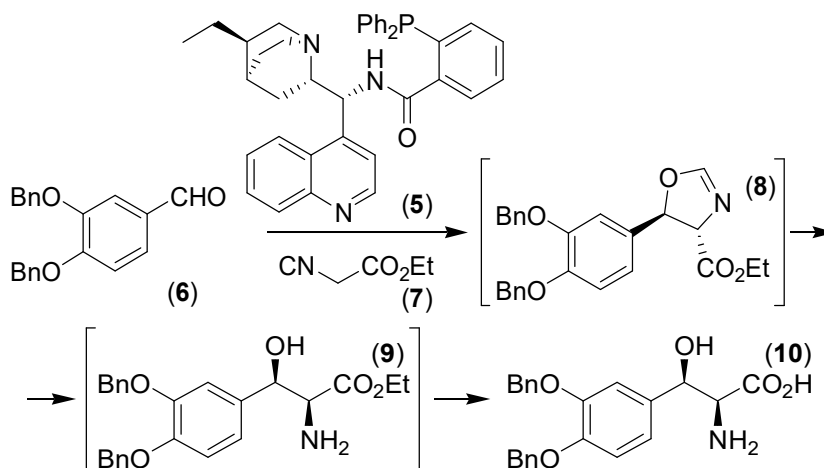
La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación del ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxiopropanoico, compuesto de fórmula (III) donde R¹ es fenilo.

20

Este ejemplo es representativo de las operaciones a) y b) del procedimiento de la invención.



25

Se cargó un tubo de ensayo de 10 ml con 3,4-dibenciloxibenzaldehído **6** (0,271 g, 0,85 mmol) y compuesto **5** (0,010 g, 2 % moles). Se añadió acetato de *iso*-propilo (2,8 ml) seguido después de 10 min de Ag₂O (0,001 g, 0,5 % moles). La mezcla se agitó a 20 °C durante 20 minutos, después se añadió gota a gota isocianoacetato de etilo **7** (0,101 g, 0,89 mmol). La reacción se agitó a 20 °C durante 1,5 horas controlando periódicamente por TLC (AcOEt/Hexano 4:6, UV y molibdato) hasta la desaparición del aldehído **6**.

30

La mezcla se filtró en un filtro de HPLC y el filtrado se concentró hasta un residuo. La oxazolina en bruto **8** (0,85 mmol teórico) se disolvió en THF (3,7 ml) y HCl 6 N (0,38 ml, 2,30 mmol). La mezcla se agitó a 50 °C durante 2 horas, controlando periódicamente por TLC (AcOEt/Hexano 4:6 y AcOEt al 100 %, UV y molibdato) hasta la desaparición de la oxazolina **8** y del compuesto de *N*-formilo correspondiente.

Cuando la conversión se hubo completado, la mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió NaOH 2 N (2,8 ml, 5,64 mm) gota a gota controlando que la temperatura interna no superara los 10 °C. La mezcla después se calentó a 25 °C y se agitó a esa temperatura durante una noche. El pH se ajustó a 5 por adición de ácido acético tras lo cual ocurrió la precipitación del aminoácido. La mezcla se calentó a 50 °C para observar una separación clara de las fases; la capa orgánica se separó y se usó tal cual en el siguiente Ejemplo.

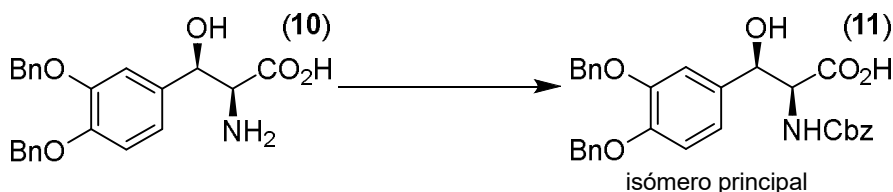
35

Ejemplo 2

40

Preparación de ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxiopropanoico, compuesto de fórmula (XI) donde R¹ es fenilo y Pg es benciloxicarbonilo.

Este ejemplo es representativo de la etapa c.ii.1) del procedimiento de la invención.



A la capa orgánica preparada como se describe en el Ejemplo 1 (0,85 mmol teóricos), se le añadió etil diisopropilamina (0,223 ml, 1,28 mmol) a 0 °C seguido de Cbz-OSu (0,234 g, 0,94 mmol) y la reacción se agitó a 25 °C durante 1 hora.

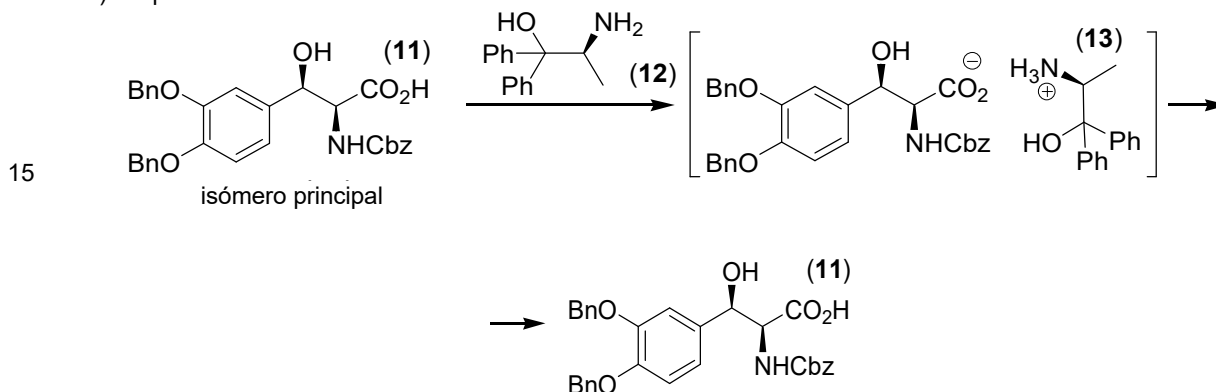
5 Cuando la reacción se hubo completado, el pH se ajustó a aproximadamente 5 con adición de una mezcla de ácido acético (0,1 ml) y agua (1,0 ml). Se retiró THF a presión reducida y el producto se extrajo con acetato de *iso*-propilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y se concentraron hasta un residuo.

Se convirtió una alícuota del residuo en Droxidopa como se describe en el ejemplo 4 y analizó por HPLC de acuerdo con el método descrito en el *Journal of Chromatography A* 1994; 675: 244-247 mostrando una relación diastereomérica

10 de 90:10 y una relación enantiomérica de 85:15 (ee = 70 %).

Ejemplo 3

Purificación de la mezcla de isómeros de ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxiopropanoico, compuesto de fórmula (XI) donde R¹ es fenilo y Pg es benciloxicarbonilo. Este ejemplo es representativo de la etapa c.ii.2) del procedimiento de la invención.



Al ácido en bruto **11** preparado como se describe en el ejemplo 2 (11,8 mmol teóricos) y disuelto en acetato de *iso*-propilo (70 ml), se le añadió (S)-2-amino-1,1-difenilpropan-1-ol (2,68 g, 11,8 mmol). La mezcla se calentó a reflujo hasta que se obtuvo una solución.

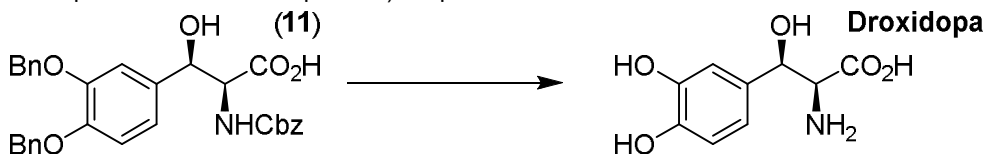
La mezcla se enfrió a 25 °C, se calentó a 60 °C durante 1 hora, se enfrió a 0 °C durante 2 horas y se agitó a la misma temperatura durante 1 hora. El sólido se filtró, se lavó con acetato de *iso*-propilo y se secó a presión reducida a 50 °C obteniendo 5,7 g de la sal **13** (rendimiento del 64 % sobre 3,4-dibenciloxi benzaldehído **6** del Ejemplo 1) con un 100 %

25 ee y una relación diastereomérica mayor de 99,9:0.1.

La sal **13** resultante se disolvió con agitación en una mezcla de agua (34 ml) y 2-metiltetrahydrofurano (24 ml) a 25 °C, después se añadió gota a gota HCl al 36 % (826 mg, 8,15 mmol), controlando que la temperatura interna no superara los 30 °C. La mezcla se mantuvo en las mismas condiciones durante 1 hora después la agitación se detuvo y las fases consiguientes se separaron. La capa orgánica se lavó y se usó sin purificación adicional en el siguiente Ejemplo.

Ejemplo 4

Preparación de ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-3-hidroxiopropanoico, es decir, Droxidopa. Este ejemplo es representativo de la etapa c.ii.3) del procedimiento de la invención.



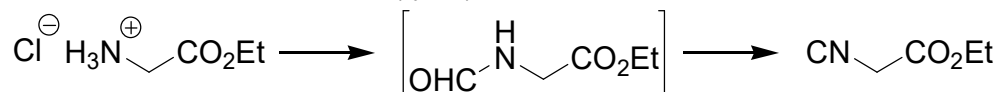
A la capa orgánica preparada como se describe en el Ejemplo 3 (7,6 mmol teórica), se le añadieron agua (15 ml) y 36 % de HCl (1,70 g, 16,8 mmol). La mezcla bifásica resultante se sometió a 3 ciclos de vacío/nitrógeno, después se le añadió Pd/C al 10 %, 50 % humedad p/p (32 mg, 0,015 mmol). La mezcla se sometió a 3 ciclos de vacío/hidrógeno después se presurizó con (2 bar) y se mantuvo con agitación a 25 °C durante 12 horas.

Cuando la conversión se hubo completado, se añadió ácido ascórbico (80 mg, 0,46 mmol), la suspensión se filtró para retirar el catalizador, las capas se separaron y la fase orgánica resultante se lavó con agua. A la fase orgánica mantenida en agitación se le añadió gota a gota una solución acuosa al 5 % de hidróxido sódico hasta que se obtuvo un pH de 5,0±0,1 (determinado mediante un peachímetro), controlando que la temperatura interna no superara los 30 °C. La suspensión se enfrió a 0 °C, se filtró y se lavó con agua. Al sólido húmedo se le añadieron ácido ascórbico

(80 mg, 0,46 mmol) y agua (5 ml) y la mezcla resultante se mantuvo con agitación durante 1 hora, después se filtró y se lavó con agua. El sólido recuperado se secó a presión reducida a 50 °C para producir 1,4 g de Droxidopa (rendimiento del 86 % a partir de la sal **13**) con 100 % ee y una relación diastereomérica mayor de 99,9:0.1.

Ejemplo 5

- 5 Preparación de 2-isocianoacetato de etilo, compuesto de fórmula (V) donde R² es etilo.
Este ejemplo es representativo de las etapas d.1) y d.2) del procedimiento de la invención.

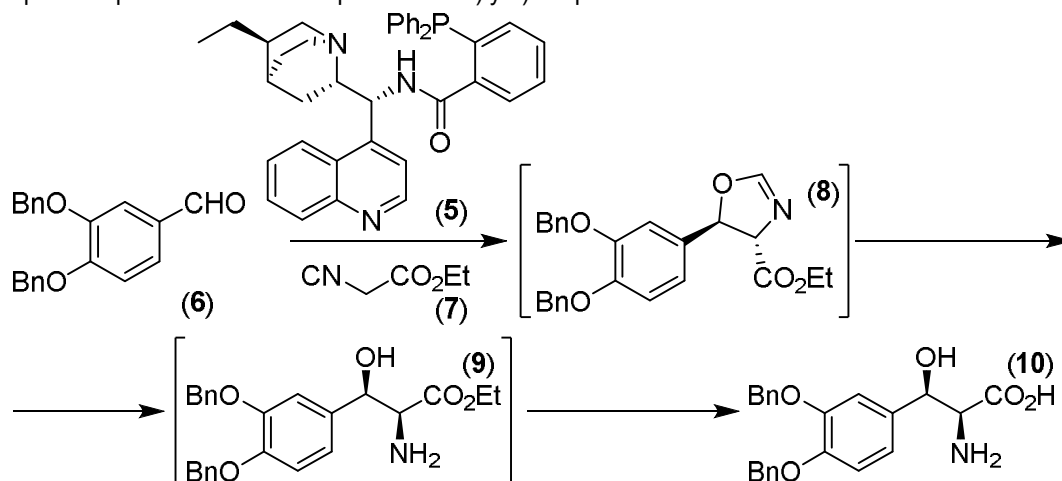


- A una suspensión de clorhidrato de éster etílico de glicina (1,63 g, 11,7 mmol) en formiato de etilo (8 ml), se le añadió trietilamina (1,31 g, 13,0 mmol) con agitación. La mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo en las mismas condiciones hasta la conversión completa (aproximadamente 20 horas). La reacción se enfrió a 25 °C, se filtró en atmósfera de nitrógeno y se lavó con formiato de etilo. La solución se concentró a presión reducida hasta un residuo, que se disolvió en diclorometano (6 ml). Se añadió diisopropilamina de etilo (4,0 g, 31,1 mmol) y la solución resultante, se enfrió a -10 °C, y se le añadió gota a gota oxocloruro de fósforo (1,9 g, 12,3 mmol) controlando que la temperatura interna no superara los 0 °C. La mezcla se agitó en las mismas condiciones hasta la conversión completa (aproximadamente 2 horas) entonces se vertió lentamente en una solución acuosa al 10 % de carbonato sódico controlando que la temperatura no interna no superara los 30 °C. Las fases resultantes se separaron y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (DCM). Las fases orgánicas se filtraron sobre un lecho de carbón vegetal y celite y se analizaron de acuerdo con el siguiente método GC;
- Método GC: Columna: DB 200, 30 m x 320 µm x 1,0 µm; Temp. del inyector: 270 °C; Temp. del detector: 340 °C; Flujo: 5,5 ml/min; Presión constante: 20,0 psi; Horno: 40 °C durante 5 min, desde 40 a 220 °C a 10 °C/min, desde 220 a 330 a 30 °C/min; Tiempo de Ejecución: 60,67 min; Relación de división: 10:1; Volumen de inyección: 0,5 µl
- Rt del éster etílico de N-formilo de glicina: 13,3 min,
Rt de 2-isocianoacetato de etilo: 8,8 min,
Rt de éster etílico de glicina: 5,9 min.
- 25 La solución de DCM que contenía 2-isocianoacetato de etilo (aproximadamente 15 ml) se usó tal cual en la reacción de aldol con 3,4-dibenciloxibenzaldehído **6** como se describe en el siguiente Ejemplo.

Ejemplo 6

Preparación de ácido (2S,3R)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxiopropanoico, compuesto de fórmula (III) donde R¹ es fenilo.

- 30 Este ejemplo es representativo de las operaciones a) y b) del procedimiento de la invención.



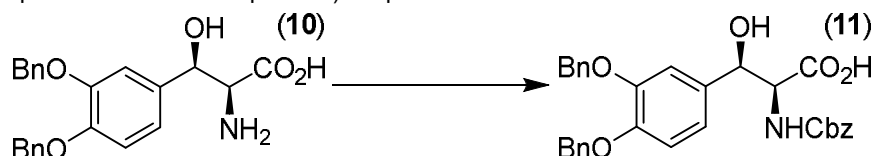
- Se cargó un tubo de ensayo de 10 ml con 3,4-dibenciloxibenzaldehído **6** (2,70 g, 8,48 mmol) y compuesto **5** (100 mg, 0,17 mmol, 2 % moles). Se añadió acetato de *iso*-propilo (23 ml) seguido después de 30 min de Ag₂O (10,0 mg, 0,34 mmol, 0,5 % moles). La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 hora, después la solución de isocianoacetato de etilo **7** (11,7 mmol teóricos) preparado como se describe en el ejemplo 5 se añadió gota a gota, controlando que la temperatura interna no superara los 25 °C. La reacción se agitó a la misma temperatura durante 2 horas controlando periódicamente por TLC (AcOEt/Hexano 4:6, UV y molibdico) hasta la desaparición del aldehído **6**.
- La mezcla se filtró en un lecho de celite y el filtrado se concentró hasta un residuo. Los disolventes residuales se co-evaporaron por separación con THF. A la oxazolina **8** en bruto (8,48 mmol teórico) disuelta en THF (16 ml), se le añadió HCl al 18 % (4,64 g, 22,9 mmol). La mezcla se agitó a 50 °C durante 2 horas, controlando periódicamente por TLC (AcOEt/Hexano 4:6 y 100 % AcOEt, UV y molibdico) hasta la desaparición de la oxazolina **8** y del compuesto de N-formilo correspondiente.

Cuando la conversión se hubo completado, la mezcla se enfrió a -5 °C y se añadió lentamente NaOH (22,4 g, 56,0 mmol) controlando que la temperatura interna no superara los 0 °C. La mezcla se mantuvo con agitación a 0 °C durante 2 horas después se calentó a 25 °C y se agitó a la misma temperatura durante una noche. El pH se ajustó a 4-5 por adición de ácido acético tras lo cual ocurrió la precipitación del aminoácido. La mezcla se calentó a 50 °C para observar una separación clara de las fases; la fase orgánica se separó y se usó tal cual en el siguiente Ejemplo.

Ejemplo 7

Ácido (2S,3R)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxiopropanoico, compuesto de fórmula (XI) en el que R¹ es fenilo y Pg es benciloxicarbonilo.

Este ejemplo es representativo de la etapa c.ii.1) del procedimiento de la invención.



A la capa orgánica preparada como se describe en el Ejemplo 6 (8,48 mmol teóricos), se le añadió diisopropilamina de etilo (1,90 ml, 11,0 mmol) a 20 °C seguido de Cbz-OSu (2,32 g, 9,33 mmol) y la reacción se agitó a 25 °C durante 1 hora. Cuando la reacción se hubo completado, el pH se ajustó a 4-5 por adición de ácido acético (0,7 ml) y agua (8 ml). El THF se retiró a presión reducida y el residuo se separó con acetato de *iso*-propilo. El producto se extrajo con acetato de *iso*-propilo, las capas orgánicas combinadas se lavaron y se concentraron hasta un residuo.

Una alícuota del residuo se convirtió en Droxidopa como se describe en el ejemplo 4 y se analizó por HPLC de acuerdo con el método descrito en *Journal of Chromatography A* 1994; 675: 244-247 mostrando una relación diastereomérica de 90:10 y una relación enantiomérica de 88:12 (*ee* = 76 %).

Ejemplos 8A-8G

La reacción de aldol descrita en el Ejemplo 1 se repitió a diferentes temperaturas. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, se midieron las relaciones diastereoméricas (d.r.), y las relaciones enantioméricas (e.r.), y *ee* resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Ejemplo	8A	8B	8C	8D	8E	8F	8G
Temperatura (°C)	10	40	60	80	0	-20	-25
d.r.	90:10	91:9	90:10	90:10	91:9	89:11	90:10
e.r.	85:15	87:13	87:13	86:14	85:15	83:17	84:16
e.e. (%)	70	74	74	72	70	66	68

Ejemplos 9A-9H

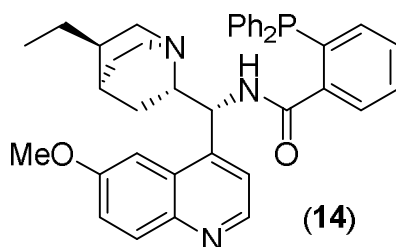
La reacción de aldol descrita en el Ejemplo 1 se repitió usando sistemas catalíticos con diferentes cantidades molares del compuesto **5** y Ag₂O con respecto al 3,4-dibenciloxibenzaldehído **6**. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, se midieron las relaciones diastereoméricas (d.r.), las relaciones enantioméricas (e.r.) y *ee* resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Ejemplo	9A	9B	9C	9D	9E	9F	9G	9H
Relación molar comp. 5 /comp. 6 (%)	1,6	1,2	0,8	0,4	0,5	1,0	3,0	4,0
Relación molar Ag ₂ O/comp. 6 (%)	0,4	0,3	0,2	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5
d.r.	90:10	90:10	90:10	85:11	85:11	85:11	85:11	85:11
e.r.	85:15	85:15	84:16	81:19	81:19	81:19	81:19	81:19
e.e. (%)	70	70	68	62	62	62	62	62

Ejemplo 10

La reacción de aldol descrita en el Ejemplo 1 se repitió usando un sistema catalítico que comprende un compuesto **14** en lugar del compuesto **5** indicado. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2, fueron respectivamente de 91:9 y 89:11 (*ee* = 78 %).

**Ejemplo 11**

La reacción de aldol descrita en el ejemplo 1 se repitió usando un sistema catalítico que comprende solo Ag_2O en lugar de la mezcla mencionada de Ag_2O y el compuesto **5**. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2, fueron respectivamente de 75:25 y 50:50 ($ee = 0\%$).

Ejemplo 12

La reacción de aldol descrita en el ejemplo 1 se repitió usando un sistema catalítico que comprendía solo el compuesto **5** en lugar de la mezcla indicada de Ag_2O y el compuesto **5**. Después de 12 horas no se observó conversión de 3,4-dibenciloxibenzaldehído **6** en oxazolina **8**.

Ejemplo 13

La reacción de aldol descrita en el ejemplo 1 se repitió usando un sistema catalítico que comprendía CuCl en lugar del Ag_2O indicado. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2, fueron respectivamente de 68:32 y 50:50 ($ee = 0\%$).

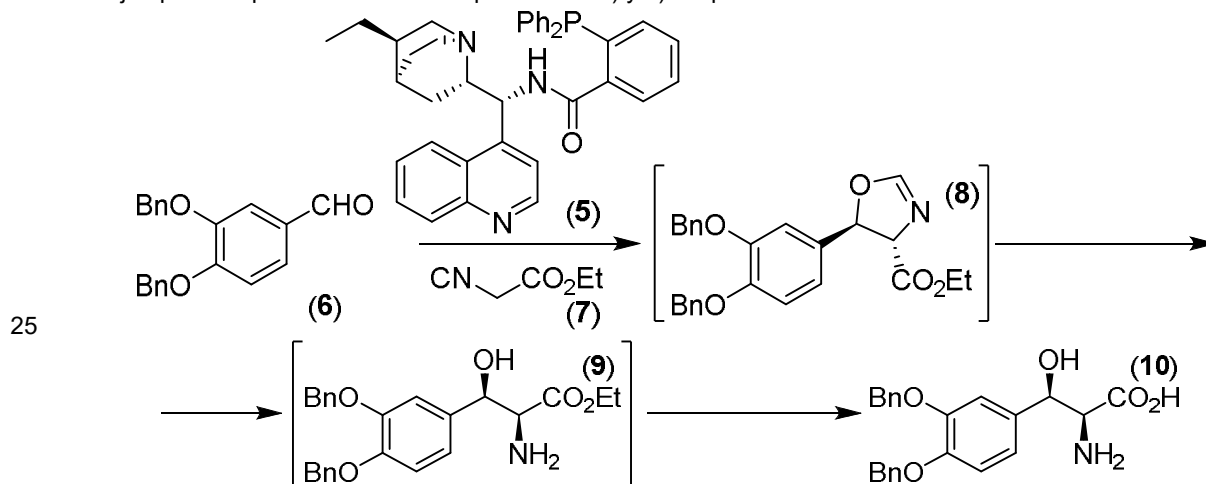
Ejemplo 14

La reacción de aldol descrita en el ejemplo 1 se repitió añadiendo tamices moleculares en polvo de 4 Å a la mezcla de aldehído **6** y el compuesto **5** y Ag_2O en acetato de *iso*-propilo. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2, fueron respectivamente de 90:10 y 87:13 ($ee = 74\%$).

Ejemplo 15

Preparación de ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxiopropanoico, compuesto de fórmula (III) donde R^1 es fenilo.

Este ejemplo es representativo de las operaciones a) y b) del procedimiento de la invención.



Se cargó un tubo de ensayo de 10 ml con 3,4-dibenciloxibenzaldehído **6** (0,271 g, 0,85 mmol) y compuesto **5** (0,025 g, 5 % en moles). Se añadió acetato de *iso*-propilo (2,8 ml) y la mezcla se agitó a 20 °C durante 10 minutos. Después se enfrió a -20 °C y se añadió Ag_2O (0,005 g, 2,5 % en moles). La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos, después se añadió gota a gota isocianoacetato de etilo **7** (0,101 g, 0,89 mmol). La reacción se agitó a la misma temperatura durante 10 horas controlando periódicamente por TLC ($\text{AcOEt/Hexano } 4:6$, UV y molibdato) hasta la desaparición del aldehído **6**.

La mezcla se filtró en un filtro de HPLC y el filtrado se concentró hasta un residuo.

La oxazolina **8** en bruto (0,85 mmol teóricos) se disolvió en THF (3,7 ml) y $\text{HCl } 6 \text{ N}$ (0,38 ml, 2,30 mmol). La mezcla se agitó a 50 °C durante 2 horas, controlando periódicamente por TLC ($\text{AcOEt/Hexano } 4:6$ y 100 % AcOEt , UV y molibdato) hasta la desaparición de la oxazolina **8** y el compuesto *N*-formilo correspondiente.

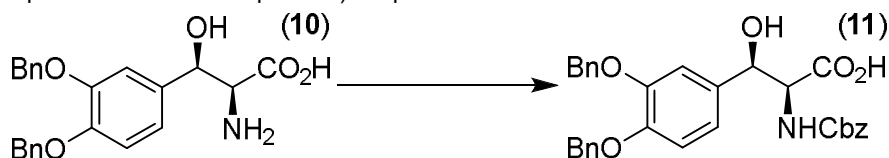
Cuando la conversión se hubo completado, la mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota $\text{NaOH } 2 \text{ N}$ (2,8 ml, 5,64 mmol) controlando que la temperatura interna no superara los 10 °C. La mezcla después se calentó a 25 °C y se agitó a la misma temperatura durante una noche. El pH se ajustó a 5 por adición de ácido acético tras lo cual ocurrió la

precipitación del aminoácido. La mezcla se calentó a 50 °C para observar una separación clara de las fases; la capa orgánica se separó y se usó como en el siguiente Ejemplo.

Ejemplo 16

Preparación de ácido (2S,3R)-2-amino-3-(3,4-bis(benciloxi)fenil)-3-hidroxi-propanoico, compuesto de fórmula (XI) donde R¹ es fenilo y Pg es benciloxicarbonilo.

Este ejemplo es representativo de la etapa c.ii.1) del procedimiento de la invención.



A la capa orgánica preparada como se describe en el Ejemplo 15 (0,85 mmol teóricos), se le añadió diisopropilamina de etilo (0,223 ml, 1,28 mmol) a 0 °C seguido de Cbz-OSu (0,234 g, 0,94 mmol) y la reacción se agitó a 25 °C durante 1 hora. Cuando la reacción se hubo completado, el pH se ajustó a aproximadamente 5 por adición de una mezcla de ácido acético (0,1 ml) y agua (1,0 ml). El THF se retiró a presión reducida y el producto se extrajo con acetato de *iso*-propilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y se concentraron hasta un residuo.

Una alícuota del residuo se convirtió en Droxidopa como se describe en el ejemplo 4 y se analizó por HPLC de acuerdo con el método descrito en *Journal of Chromatography A* 1994; 675: 244-247 mostrando una relación diastereomérica de 91:9 y una relación enantiomérica de 84:16 (ee = 68 %).

Ejemplos 17A-17F

La reacción de aldol descrita en el Ejemplo 15 se repitió usando diferentes disolventes en lugar del acetato de *iso*-propilo indicado.

Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, se midieron las relaciones diastereomérica (d.r.), enantiomérica (e.r.) y ee resultantes, determinadas como se describe en el Ejemplo 16. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 3; en la primera columna, se informa del disolvente específico ensayado en cada Ejemplo.

Tabla 3

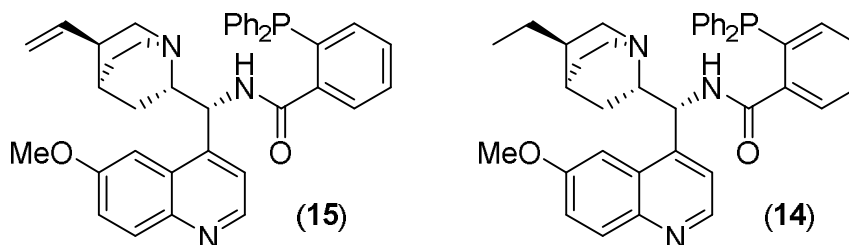
Ejemplo	Disolvente	d.r.	e.r.	ee. (%)
17A	Acetato de etilo	90:10	84:16	68
17B	Acetonitrilo	85:15	80:20	60
17C	Metil <i>tert</i> -butil éter	90:10	81:19	62
17D	Ciclopentil metil éter	90:10	80:20	60
17E	Tetrahidrofurano	86:14	84:16	68
17F	2-metil tetrahidrofurano	87:13	86:14	72

Ejemplo 18

La reacción de aldol descrita en el Ejemplo 8E se repitió usando isocianoacetato de *tert*-butilo en lugar del isocianoacetato de etilo indicado. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el Ejemplo 16, fueron respectivamente de 93:7 y 92:8 (ee = 84 %).

Ejemplo 19

La reacción de aldol descrita en el ejemplo 1 se repitió usando un sistema catalítico que comprende una mezcla 85:15 de los compuestos **15** y **14** en lugar del compuesto **5** mencionado. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2, fueron respectivamente de 91:9 y 88:12 (ee = 76 %).



mezcla 85:15

Ejemplo 20

La reacción de aldol descrita en el ejemplo 8B se repitió usando un sistema catalítico que comprendía una mezcla 85:15 de los compuestos **15** y **14** en lugar del compuesto **5** indicado. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el ejemplo 2, fueron respectivamente de 92:8 y 90:10 (ee = 80 %).

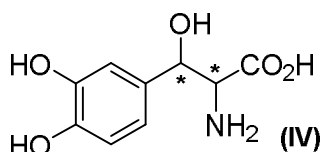
Ejemplo 21

La reacción de aldol descrita en el Ejemplo 20 se repitió usando isocianoacetato de *terc*-butilo en lugar del isocianoacetato de etilo indicado. Tras la conversión de la oxazolina **8** en el aminoácido **11** protegido, a través del aminoácido **10**, las relaciones diastereomérica y enantiomérica resultantes, determinadas como se describe en el

5 Ejemplo 16, fueron respectivamente de 96:4 y 95:5 (*ee* = 90 %).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura de un aminoácido de fórmula general (IV) o una sal del mismo:

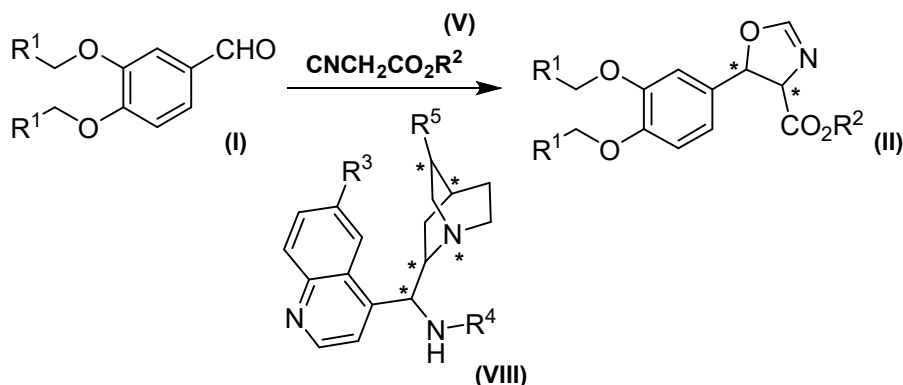


5

comprendiendo dicho procedimiento las siguientes operaciones sintéticas:

a) preparar una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) haciendo reaccionar un benzaldehído (I) con un isocianoacetato (V) en presencia de un sistema catalítico que comprende un derivado alcaloide de 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* (VIII) y una sal de plata u oro o una mezcla de

10 las mismas:

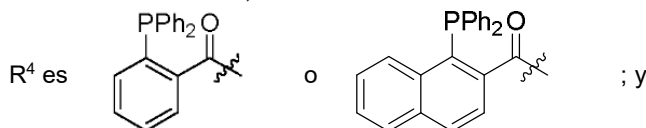


donde:

R¹ es un arilo C6-C10 o un arilo C6-C10 sustituido;

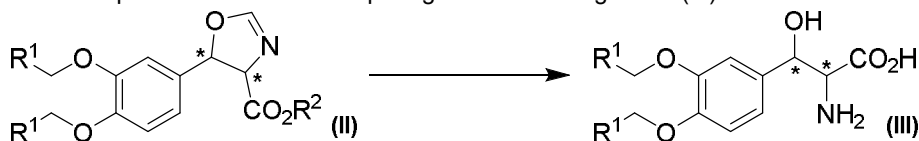
15 R² es un alquilo C1-C6 lineal o ramificado, un arilo C6-C10 o un alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido con un arilo C6-C10;

R³ es H, OH, o un alcoxi C1-C6 lineal o ramificado;



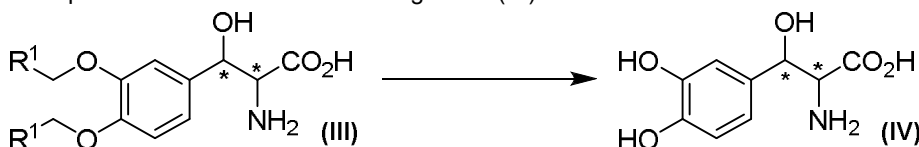
R⁵ es un etilo o un grupo vinilo.

b) convertir dicha mezcla enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III):



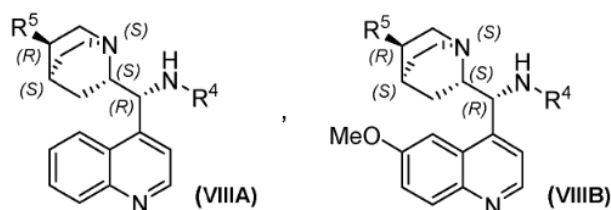
20

c) convertir la mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV):

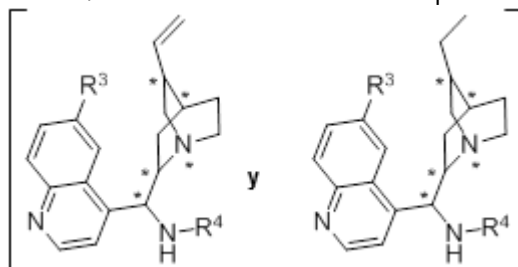


25

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho derivado alcaloide de 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* se selecciona entre un compuesto de fórmula (VIII A) o (VIII B):



3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usa una mezcla de derivados alcaloides de 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* insaturados/saturados en la reacción de la operación a).



5

4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas sales de plata u oro se seleccionan entre acetato de plata, carbonato de plata, óxido de plata, cloro(trifenilfosfina)oro o una mezcla de las mismas.

10 5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de isocianoacetato (V) está entre 1 y 1,5 equivalentes con respecto a la cantidad de benzaldehído (I) usado.

6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad molar del derivado alcaloide de 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* está entre 1/200 y 1/20 con respecto a la cantidad de benzaldehído de fórmula general (I) usado.

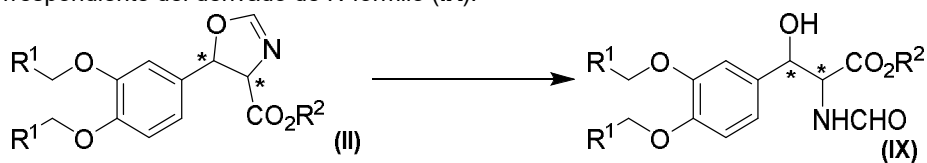
15

7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad molar de dicha sal de plata u oro o de la mezcla de las mismas con respecto al derivado alcaloide de 9-amino(9-desoxi)epi *Cinchona* en el sistema catalítico está entre 1:1 y 1:8 (mol/mol).

20

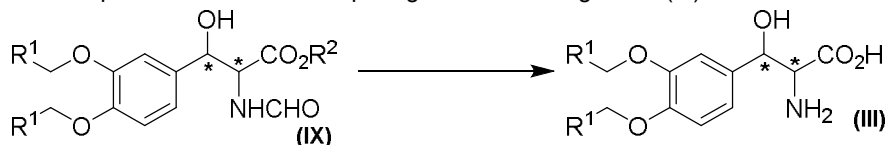
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la operación b) incluye las siguientes etapas:

b.1) convertir la mezcla enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) preparada en la operación a) en la mezcla enriquecida correspondiente del derivado de *N*-formilo (IX):



25

b.2) convertir dicha mezcla enriquecida del derivado de *N*-formilo (IX) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III):



donde R¹ y R² tienen los significados dados anteriormente.

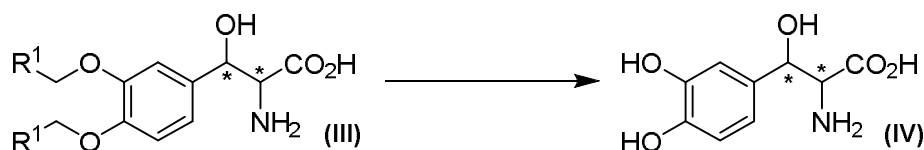
30

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el resto éster del derivado de *N*-formilo (IX) se hidroliza en condiciones ácidas o básicas.

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la operación c) se lleva a cabo de acuerdo con una primera ruta de síntesis alternativa c.i), que incluye las siguientes etapas:

35

c.i.1) convertir la mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (III) preparada en la operación b) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV):

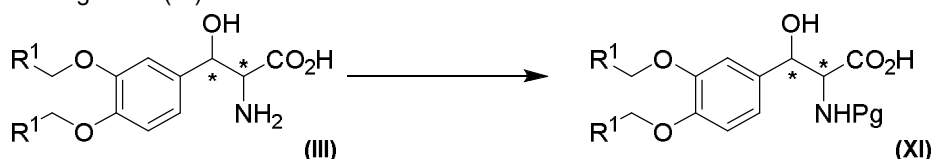


donde R¹ tiene los significados dados anteriormente;

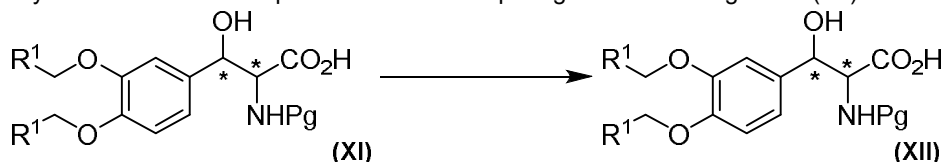
- c.i.2) convertir la mezcla enriquecida del aminoácido de fórmula general (IV) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del mismo por cristalización de una solución supersaturada de dicha mezcla enriquecida 5 (IV) en agua o en una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua.

11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la operación c) se lleva a cabo de acuerdo con una segunda ruta de síntesis alternativa c.ii), que incluye las siguientes etapas:

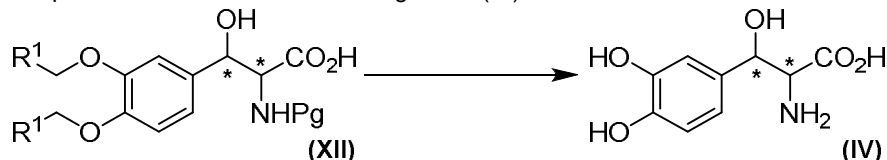
- c.ii.1) proteger el grupo amino de la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida del aminoácido 10 protegido de fórmula general (III) preparado en la operación b), produciendo una mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI):



c.ii.2) convertir dicha mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido protegido de fórmula general (XII):



- 15 c.ii.3) convertir la mezcla pura del aminoácido protegido de fórmula general (XII) en una mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura del aminoácido de fórmula general (IV):

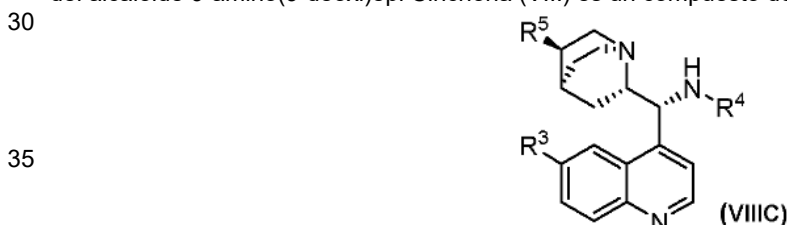


donde:

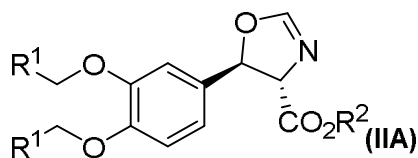
- 20 R¹ tiene los significados dados anteriormente; y
Pg es un grupo protector de nitrógeno.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa c.ii.2) se lleva a cabo tratando dicha mezcla enriquecida del aminoácido protegido de fórmula general (XI), opcionalmente aislado, con una amina ópticamente 25 activa para obtener la sal correspondiente, seguido de una resolución de sal diastereomérica de los dos enantiómeros del producto *treo* y desbloqueando la mezcla diastereomérica y enantioméricamente pura por tratamiento con un ácido.

13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12, en el que en la operación a) el derivado del alcaloide 9-amino(9-deoxi)jepi Cinchona (VIII) es un compuesto de fórmula (VIIIc)

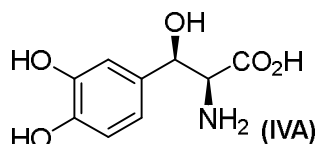


donde R³, R⁴ and R⁵ son como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12, y la mezcla diastereomérica y enantioméricamente enriquecida de la oxazolina de fórmula general (II) es una *trans*-oxazolina 40 enantioméricamente enriquecida de fórmula general (IIA):



mezcla *trans*-enantioméricamente enriquecida

y el procedimiento da lugar a la formación de un *treo*-aminoácido enantioméricamente puro de fórmula general (IVA):

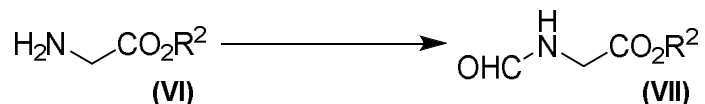


5

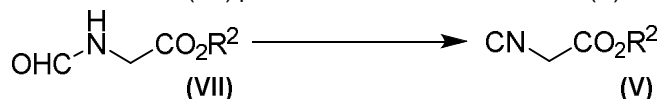
mezcla *treo*-enantioméricamente purificada.

14. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una operación preliminar d) de preparación de los isocianoacetatos (V) para su uso en la operación a), comprendiendo dicha operación d) las siguientes etapas:

d.1) convertir un derivado de glicina de fórmula (VI) o una sal del mismo, por tratamiento con un formiato, en el derivado de *N*-formilo (VII) correspondiente:



d.2) deshidratar dicho derivado de *N*-formilo (VII) para obtener un isocianoacetato (V):



15

donde R² es un alquilo C1-C6 lineal o ramificado, un arilo C6-C10, o un alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido con un arilo C6-C10.

15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la solución resultante de la etapa d.2) se usa tal cual en la reacción de la operación a).