

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 926**

51 Int. Cl.:

C07D 207/46 (2006.01)

C07D 207/452 (2006.01)

C07D 213/71 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2011 E 16186412 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3153504**

54 Título: **Métodos para la preparación de agentes de reticulación cargados**

30 Prioridad:

09.12.2010 US 421357 P

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

06.03.2019

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**LI, WEI y
ZHAO, ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 702 926 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

Métodos para la preparación de agentes de reticulación cargados

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para preparar agentes de reticulación que portan ácido sulfónico. El resto de ácido sulfónico puede ser un ácido libre o una sal, o una mezcla de ácido libre y sales. Estos conectores se emplean para preparar conjugados mediante la unión covalente de dos entidades entre sí, en las que una entidad contiene un grupo amino o hidroxilo, y la otra entidad contiene un grupo tiol. El resto de ácido sulfónico de estos conectores mejora la solubilidad acuosa de los conjugados resultantes.

Antecedentes de la invención

10 Los compuestos que pueden unir entre sí un resto que porta tiol y un resto que porta amina pueden utilizarse en muchas aplicaciones diversas, tales como la conexión de agentes citotóxicos, fluoróforos o agentes quelantes de metales a agentes de unión a células, tales como anticuerpos, factores del crecimiento o vitaminas, o a grandes complejos, tales como liposomas (véanse las Patentes de EEUU Nos. 5.208.020; 5.416.064; 5.846.545; 6.340.701; 6.716.821; 7.217.819; 7.276.497; 7.388.026; 7.598.290 y la Publicación de Patente de EEUU No. 20100203007).

15 Los ejemplos de estos conectores incluyen SPP, SPDP, SPDB y SMCC (Figura 1) (véanse las Patentes de EEUU Nos. 4.563.304; 6.913.748; 7.276.497; Widdison et al., 2006, J. Med. Chem., 49, 4392-4408; Phillips et al., 2008, Cancer Res., 68, 9280-9290). A menudo, una o ambas de las entidades que se van a conectar entre sí solo tienen una solubilidad en agua limitada, lo cual da como resultado que el conjugado resultante presenta una baja solubilidad acuosa.

20 Recientemente, se ha mostrado que los conjugados de anticuerpo-fármaco, en los que el anticuerpo y el fármaco citotóxico se unieron a través de agentes de reticulación cargados, en especial los que comprenden un sustituyente ácido sulfónico, mostraron varias ventajas frente a los conjugados correspondientes preparados con conectores no cargados (Figura 2). Estas ventajas incluyen a) mayor solubilidad acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco, b) capacidad para aumentar la carga de fármaco en el anticuerpo, al mismo tiempo que se mantiene la solubilidad y el contenido en monómero, y c) mayor actividad terapéutica, en especial contra células resistentes a múltiples fármacos (véanse las Publicaciones de Patente de EEUU Nos. 20090274713 y 20100129314). Recientemente, también se ha indicado una mejor eficacia preclínica de los conjugados de anticuerpo-fármaco preparados con el agente de reticulación sulfo-SPDB [Figura 2, compuesto (V)] que comprende un sustituyente ácido sulfónico (Kovtun et al., 2010, European J. Cancer, supl. 8, p. 76, Resumen No. 235). La única síntesis previamente indicada de sulfo-SPDB es un proceso largo e ineficiente que comprende 6 etapas químicas (Figura 3, véase la Publicación de Patente de EEUU No. 20090274713). Por tanto, es necesario proporcionar un proceso simplificado y escalable para la preparación de agentes de reticulación cargados, tales como sulfo-SPDB, que comprenden un grupo ácido sulfónico. Estas y otras necesidades se abordan en la presente invención.

Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona un proceso como se define en la reivindicación 1.

En la presente memoria también se describen procesos para preparar conectores heterobifuncionales que portan ácido sulfónico. Estos conectores portan un resto tiol reactivo para conectar un componente, tal como un fármaco citotóxico, a través de un enlace disulfuro o un enlace tioéter, y un resto reactivo amina o hidroxilo para conectar un segundo componente, tal como un agente de unión a células, a través de un enlace amida o éster. El resto de ácido sulfónico de estos conectores está localizado en el carbono alfa respecto al carbono que porta el resto reactivo amina o hidroxilo, y puede existir como un ácido sulfónico libre o como una sal. También se describe la conversión del ácido sulfónico en ácido libre, o una forma de sal no deseada en una forma de sal sustancialmente específica deseada, tal como una sal de sodio o una sal de potasio.

40

Descripción de las Figuras

45 La Figura 1 muestra las estructuras de conectores no cargados previamente descritos.

La Figura 2 muestra las estructuras de sulfo-SPDB y un conjugado de anticuerpo-fármaco preparado con sulfo-SPDB.

La Figura 3 muestra la síntesis de sulfo-SPDB de la técnica anterior.

La Figura 4 muestra la síntesis de sulfo-SPDB empleando el nuevo método.

50 La Figura 5 muestra la síntesis de agentes de reticulación de ácido α -sulfónico que contienen disulfuro. J es H o un catión descrito en la presente memoria.

La Figura 6 muestra la síntesis de agentes de reticulación de ácido α -sulfónico que contienen maleimida. J es H o un catión descrito en la presente memoria.

La Figura 7 muestra la síntesis de agentes de reticulación de ácido α -sulfónico que contienen haloacetamido. J es H o un catión descrito en la presente memoria.

La Figura 8 muestra el patrón de difracción de polvo de rayos X de la Forma Cristalina 1 del compuesto (V).

La Figura 9 muestra los perfiles de TGA y DSC de la Forma Cristalina 1 del compuesto (V).

5 La Figura 10 muestra el perfil GSV de la Forma Cristalina 1 del compuesto (V).

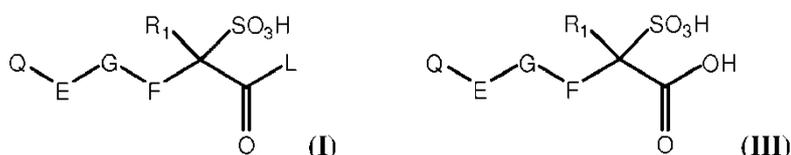
La Figura 11 muestra el patrón de difracción de polvo de rayos X de la Forma Cristalina 2a del compuesto (V).

La Figura 12 muestra los perfiles de TGA y DSC de la Forma Cristalina 2a del compuesto (V).

La Figura 13 muestra el perfil GSV de la Forma Cristalina 2a del compuesto (V).

Descripción detallada de la invención

10 Los métodos descritos en la presente memoria son para la preparación de compuestos que comprenden un grupo reactivo a tiol, un sustituyente de ácido sulfónico y un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico que es capaz de reaccionar con un grupo amina o hidroxilo. Los compuestos que pueden prepararse mediante el proceso descrito en la presente memoria se representan mediante la fórmula (I) y (III):



15 o una de sus sales, en las que,

Q representa un resto reactivo a tiol, Q puede ser un grupo disulfuro seleccionado de, pero no limitado a, disulfuro de alquilo, disulfuro de fenilo, disulfuro de orto o paranitrofenilo, disulfuro de 2,4-dinitrofenilo, disulfuro de piridilo, disulfuro de nitropiridilo; un grupo maleimido, un grupo haloacetilo o un grupo haloacetamido. Preferiblemente, Q se selecciona de un disulfuro de piridilo, un disulfuro de nitropiridilo, un grupo maleimido, bromoacetamido o yodoacetamido. Más preferiblemente, Q se selecciona de un disulfuro de piridilo o un grupo maleimido. Aún más preferiblemente, Q es un disulfuro de piridilo.

20 E representa un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenilo, un grupo heterocicloalquilo de tres a seis miembros o un grupo heteroaromático de cinco o seis miembros, que contiene 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de O, N o S. Preferiblemente, E se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que contiene 1 a 6 átomos de carbono, un grupo fenilo o piperidina. Más preferiblemente, E es un alquilo lineal que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Aún más preferiblemente, E se representa por $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

F es un resto opcional que tiene la misma definición que E. Preferiblemente, F es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Aún más preferiblemente, F está ausente

30 Alternativamente, cuando G está ausente, F y R_1 , junto con el átomo de carbono al cual están unidos, pueden formar un grupo cicloalquilo de tres a siete miembros. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es un grupo ciclohexilo.

G está ausente o representa $-\text{G}'-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ o $-\text{G}'-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, en donde n es 0 o un número entero de 1 a 24; G' está ausente, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2-$ o $-\text{NR}_2\text{C}(=\text{O})-$; y R_2 es H o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono. G puede ser $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, en donde n es 0 o un número entero de 1 a 5. Preferiblemente, R_2 es H o Me. Preferiblemente, n es 2 o 4. Alternativamente, G es un aminoácido o una unidad peptídica, representada por $-(\text{AA})_m-$, en donde AA es un residuo de aminoácido; y m es 0 o un número entero de 1 a 6. Cuando m es 1, AA es preferiblemente glicina o alanina. Alternativamente, m puede ser 2 o 3. Preferiblemente, G es gly-gly o gly-gly-gly. Aún más preferiblemente, G está ausente.

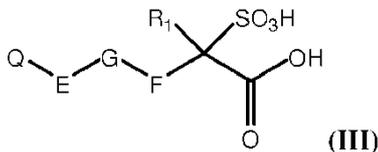
40 R_1 es H o alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, R_1 se selecciona de H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Más preferiblemente, R_1 es H.

$\text{C}(=\text{O})\text{L}$ es un grupo éster o tioéster reactivo. El grupo éster o tioéster reactivo puede seleccionarse de, pero no está limitado a, un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxisulfosuccinimida, éster de nitrofenilo, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, un éster de tiopiridilo y un éster de tionitrofenilo. Preferiblemente, el grupo éster reactivo es un éster de N-hidroxisuccinimida.

45 Para los compuestos de fórmula (I) y (III), G y F pueden estar ambos ausentes, E es un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono. Preferiblemente, E es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

Para los compuestos de fórmula (I) y (III), G puede estar ausente y F y R₁ juntos forman un grupo cicloalquilo de tres a siete miembros. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es ciclohexilo. Más preferiblemente, E es un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono. Aún más preferiblemente, E es -CH₂-.

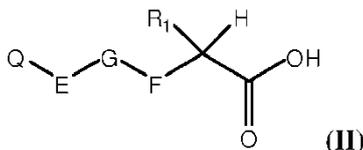
En la presente memoria también se describe un proceso para la preparación de compuestos de fórmula (III):



5

o una de sus sales, que comprende las siguientes etapas:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)



10

o una de sus sales, con un agente sulfonante opcionalmente en presencia de una base para proporcionar el compuesto de fórmula (III); en la que las definiciones de Q, E, G, F y R₁ son como se indicó anteriormente. Preferiblemente, el agente sulfonante se selecciona de, pero no está limitado a, ácido clorosulfónico y trióxido de azufre. Más preferiblemente, el agente sulfonante es ácido clorosulfónico. Preferiblemente, la base se selecciona de, pero no está limitado a, trietilamina, diisopropiletilamina o tributilamina, o 4-alquilmorfolina, tal como 4-metilmorfolina. Más preferiblemente, la base es diisopropiletilamina;

15

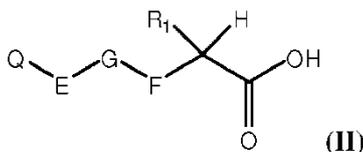
b) Opcionalmente purificar el producto. Los métodos de purificación son conocidos en la técnica e incluyen la cromatografía y/o la cristalización. Las formas adecuadas de purificación cromatográfica incluyen, pero no están limitadas a, cromatografía sólida/líquida, tal como cromatografía de resolución rápida, cromatografía de presión intermedia, o cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que incluye cromatografía en fase normal, en fase inversa, de pareja de iones y de intercambio iónico, cromatografía supercrítica y formas de cromatografía líquida/líquida, tales como cromatografía a contracorriente, cromatografía a contracorriente de gotas, cromatografía de reparto centrífugo, cromatografía a contracorriente de alta velocidad o una combinación de las anteriores en cualquier orden. Preferiblemente, el producto se purifica mediante cromatografía en fase inversa.

20

En la presente memoria también se describe un proceso para la preparación de compuestos de fórmula (I), o una de sus sales, que comprende las siguientes etapas:

25

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)



30

o una de sus sales, con un agente sulfonante opcionalmente en presencia de una base para proporcionar el compuesto de fórmula (III), o una de sus sales; en la que las definiciones de Q, E, G, F y R₁ son como se indicó anteriormente. Preferiblemente, el agente sulfonante se selecciona de, pero no está limitado a, ácido clorosulfónico y trióxido de azufre. Más preferiblemente, el agente sulfonante es ácido clorosulfónico. Preferiblemente, la base se selecciona de, pero no está limitado a, trietilamina, tal como trietilamina, diisopropiletilamina (DIPEA) o tributilamina, o 4-alquilmorfolina, tal como 4-metilmorfolina. Más preferiblemente, la base es diisopropiletilamina;

35

b) Opcionalmente purificar el producto. Los métodos de purificación son conocidos en la técnica e incluyen la cromatografía y/o la cristalización. Las formas adecuadas de purificación cromatográfica incluyen, pero no están limitadas a, cromatografía sólida/líquida, tal como cromatografía de resolución rápida o cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que incluye cromatografía en fase normal, en fase inversa, de pareja de iones y de intercambio iónico, cromatografía supercrítica y formas de cromatografía líquida/líquida, tales como cromatografía a contracorriente, cromatografía a contracorriente de gotas, cromatografía de reparto centrífugo, cromatografía a contracorriente de alta velocidad o una combinación de las anteriores en cualquier orden. Preferiblemente, el producto se purifica mediante cromatografía en fase inversa.

40

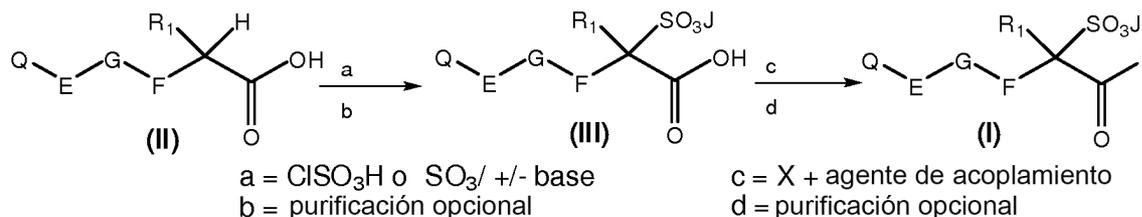
c) Hacer reaccionar el resto ácido carboxílico del producto de fórmula (III), o una de sus sales, con un compuesto hidroxilo o mercapto en presencia de un reactivo de acoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (I), o

una de sus sales. Preferiblemente, el compuesto hidroxilo o mercapto se selecciona de, pero no está limitado a, *N*-hidroxisuccinimida, *N*-hidroxisulfosuccinimida, tetrafluorofenol, nitrofenol, dinitrofenol o tiopiridina. Más preferiblemente, el compuesto hidroxilo o mercapto es *N*-hidroxisuccinimida. Preferiblemente, el agente de acoplamiento se selecciona de, pero no está limitado a, *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). Más preferiblemente, el agente de acoplamiento es EDC.

5

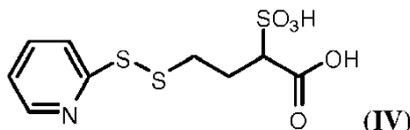
d) Purificación opcional del compuesto de fórmula (I) resultante por métodos cromatográficos y/o cristalización por medio de los métodos listados anteriormente.

A continuación, se presenta una representación esquemática de las etapas del proceso:



10 en la que las definiciones son como anteriormente; X se selecciona de *N*-hidroxisuccinimida, *N*-hidroxisulfosuccinimida, tetrafluorofenol, nitrofenol, dinitrofenol o tiopiridina; y J es H o un catión salino descrito en la presente memoria.

En la presente memoria también se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (IV):



15 o una de sus sales, que comprende:

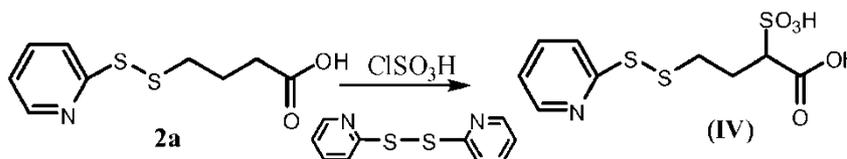
a) hacer reaccionar el ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (2a), o una de sus sales, con un agente sulfonante, opcionalmente en presencia de una base para proporcionar ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (IV), o una de sus sales. Preferiblemente, el agente sulfonante se selecciona de ácido clorosulfónico o trióxido de azufre. Más preferiblemente, el agente sulfonante es ácido clorosulfónico. Preferiblemente, la base se selecciona de, pero no está limitada a, trietilamina, diisopropiletilamina o tributilamina. Más preferiblemente, la base es diisopropiletilamina.

20



La reacción del compuesto (2a), o una de sus sales, con un agente sulfonante puede llevarse a cabo en presencia de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (PySSPy). Puede utilizarse una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 equivalentes, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 equivalentes de PySSPy con relación al compuesto (2a). Preferiblemente, pueden utilizarse aproximadamente 0,5 equivalentes (por ejemplo, 0,4, 0,5, 0,6 equivalentes) de PySSPy.

25

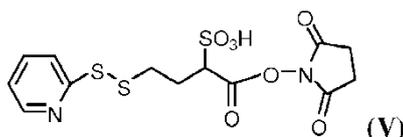


Alternativamente, puede añadirse PySSPy después de la reacción o durante el procesamiento de la reacción, tal como durante la extracción del producto de la mezcla de reacción.

30 El ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (2a) puede prepararse según procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Widdison W.C. et al., Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer, J. Med. Chem., 2006, 49:4392-4408, cuyas enseñanzas completas se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad.

b) Purificación opcional mediante cromatografía y/o cristalización. El compuesto de fórmula (IV) puede purificarse mediante cromatografía. Los expertos en la técnica pueden determinar las formas adecuadas de purificación cromatográfica y estas incluyen, pero no están limitadas a, las descritas anteriormente. Preferiblemente, la cromatografía es una cromatografía en fase inversa. Preferiblemente, el compuesto de fórmula (IV) se purifica en una columna de sílice empleando un disolvente o disolventes de elución adecuados. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (IV) se purifica en una columna de sílice empleando una mezcla de agua y uno o más disolventes orgánicos como el disolvente de elución. Por ejemplo, el disolvente de elución puede ser una mezcla de agua y acetonitrilo, opcionalmente con una pequeña cantidad de un ácido, por ejemplo, ácido acético. Más específicamente, el disolvente de elución es una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético en una proporción en volumen de 1:10:0,01.

En la presente memoria también se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (V):



o una de sus sales, que comprende:

a) hacer reaccionar el ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (2a), o una de sus sales, con un agente sulfonante, opcionalmente en presencia de una base para proporcionar ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (IV), o una de sus sales. Preferiblemente, el agente sulfonante se selecciona de ácido clorosulfónico o trióxido de azufre. Más preferiblemente, el agente sulfonante es ácido clorosulfónico. Preferiblemente, la base se selecciona de, pero no está limitada a, trietilamina, diisopropiletilamina o tributilamina. Más preferiblemente, la base es diisopropiletilamina.

La reacción del compuesto (2a), o una de sus sales, con un agente sulfonante puede llevarse a cabo en presencia de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (PySSPy). Puede utilizarse una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 equivalentes, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 equivalentes de PySSPy con relación al compuesto (2a). Preferiblemente, pueden utilizarse aproximadamente 0,5 equivalentes (por ejemplo, 0,4, 0,5, 0,6 equivalentes) de PySSPy.

Alternativamente, puede añadirse PySSPy después de la reacción o durante el procesamiento de la reacción, tal como durante la extracción del producto de la mezcla de reacción.

b) Purificación opcional mediante cromatografía y/o cristalización. El compuesto de fórmula (IV) puede purificarse mediante cromatografía. Los expertos en la técnica pueden determinar las formas adecuadas de purificación cromatográfica y estas incluyen, pero no están limitadas a, las descritas anteriormente. Preferiblemente, la purificación es por cromatografía en fase inversa. Preferiblemente, el compuesto de fórmula (IV) se purifica en una columna de sílice empleando un disolvente de elución adecuado. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (IV) se purifica en una columna de sílice empleando una mezcla de agua y un disolvente orgánico como el disolvente de elución. Por ejemplo, el disolvente de elución puede ser una mezcla de agua y acetonitrilo, opcionalmente con una pequeña cantidad de un ácido, por ejemplo, ácido acético. Más específicamente, el disolvente de elución es una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético en una proporción en volumen de 1:10:0,01.

c) Hacer reaccionar el resto ácido carboxílico del compuesto de fórmula (IV), o una de sus sales, con N-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de un reactivo de acoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (V). El agente de acoplamiento puede seleccionarse de, pero no está limitado a, N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC), 1-metil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). Más preferiblemente, el agente de acoplamiento es EDC.

La reacción del compuesto de fórmula (IV) con N-hidroxisuccinimida se lleva a cabo en presencia de una base. Preferiblemente, la base se selecciona de, pero no está limitado a, trietilamina, tal como trietilamina, diisopropiletilamina o tributilamina, o 4-alquilmorfolina, tal como 4-metilmorfolina. Más preferiblemente, la base es diisopropiletilamina.

d) Purificación opcional del compuesto de fórmula (V) resultante por métodos cromatográficos y/o cristalización por medio de los métodos listados anteriormente.

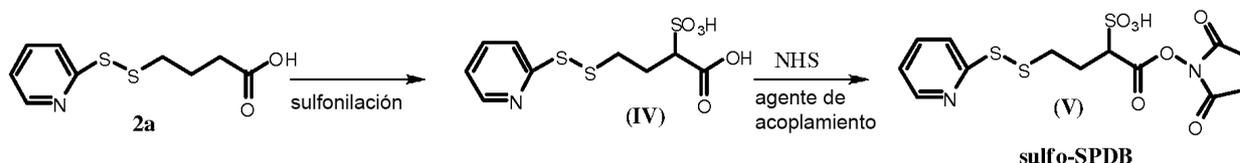
El compuesto de fórmula (V) puede purificarse mediante los métodos cromatográficos descritos en la presente memoria. El compuesto de fórmula (V) puede purificarse, en particular, en una columna de sílice empleando un disolvente de elución. El disolvente de elución contiene opcionalmente una pequeña cantidad de una base no nucleófila, que incluye, pero no está limitada a, trietilamina, tal como trietilamina, diisopropiletilamina o tributilamina, o 4-alquilmorfolina, tal como 4-metilmorfolina. Preferiblemente, la base es diisopropiletilamina. Alternativamente, puede utilizarse una columna de intercambio iónico para purificar aún más el compuesto de fórmula (V) después de una purificación en una columna de sílice, en particular cuando se emplea una base en la reacción del compuesto de fórmula (IV) con NHS para formar el compuesto de fórmula (V) o cuando se añade una

base no nucleófila después de la reacción, durante el procesamiento o durante la purificación del compuesto (V). Las columnas de intercambio catiónico adecuadas son muy conocidas en la técnica, por ejemplo, las descritas en los catálogos de Sigma-Aldrich o Supelco. Las resinas de intercambio catiónico pueden ser las resinas Amberlyst® 15 o Dowex® 50WX4-200.

5 El compuesto de fórmula (V) se purifica mediante la cristalización de la sal del compuesto de fórmula (V) en un disolvente orgánico o una mezcla de un disolvente orgánico y agua en presencia de un ácido para formar la forma neutra del compuesto de fórmula (V). En la presente memoria también se describe la cristalización que se lleva a cabo disolviendo el compuesto de fórmula (V) en uno o más disolventes hidrófilos, seguido de la colocación de la disolución resultante a temperatura reducida, por ejemplo, entre aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, por debajo de 0 °C, entre aproximadamente -10 °C a aproximadamente 0 °C, entre aproximadamente -20 °C a aproximadamente -10 °C, entre aproximadamente -30 °C a aproximadamente -20 °C, aproximadamente -10 °C, aproximadamente -20 °C o aproximadamente -30 °C. Preferiblemente, la temperatura reducida es aproximadamente -20 °C. Puede utilizarse cualquier disolvente hidrófilo adecuado. Los disolventes hidrófilos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, acetona, dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), acetonitrilo y sus mezclas. Preferiblemente, el disolvente hidrófilo es acetona o acetonitrilo.

En la presente memoria también se describe la purificación del compuesto de fórmula (V) mediante cristalización en una mezcla de disolvente orgánico y agua. Puede utilizarse cualquier disolvente orgánico. Por ejemplo, el disolvente orgánico puede ser un disolvente miscible en agua, tal como acetona, DMF, DMSO, acetonitrilo o sus mezclas. Preferiblemente, el disolvente de cristalización es una mezcla de acetona y agua. Más específicamente, la proporción de acetona y agua es de aproximadamente 80:20 v/v a aproximadamente 99:1. Aún más específicamente, la proporción en volumen de acetona a agua es de 90:10 o 95:5. La cristalización puede llevarse a cabo disolviendo el compuesto de fórmula (V) en una mezcla de disolventes, seguido de la colocación de la disolución resultante a temperatura reducida, por ejemplo, entre aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, por debajo de 0 °C, entre aproximadamente -10 °C a aproximadamente 0 °C, entre aproximadamente -20 °C a aproximadamente -10 °C, entre aproximadamente -30 °C a aproximadamente -20 °C, aproximadamente -10 °C, aproximadamente -20 °C o aproximadamente -30 °C. Preferiblemente, la temperatura reducida es aproximadamente -20 °C.

El compuesto de fórmula (V) puede existir en una forma de sal, por ejemplo, cuando la reacción del compuesto de fórmula (IV) con N-hidroxisuccinimida se lleva a cabo en presencia de una base, o cuando se añade una base no nucleófila después de la reacción, durante el procesamiento de la reacción o durante la purificación del compuesto (V). El compuesto de fórmula (V) puede ser una sal de trietilamina, una sal de diisopropiletilamina o una sal de 4-metilmorfolina, preferiblemente una sal de diisopropiletilamina. La forma neutra del compuesto puede prepararse haciendo pasar la sal a través de una columna de intercambio iónico, según se describió anteriormente. Alternativamente, la forma neutra del compuesto puede prepararse mediante la cristalización de las sales descritas anteriormente en un disolvente orgánico o una mezcla de un disolvente orgánico y agua, en presencia de una pequeña cantidad de un ácido. Puede emplearse cualquier ácido adecuado. Los ácidos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, ácido trifluoroacético (TFA), HCl, y H₂SO₄. Preferiblemente, el ácido es HCl o H₂SO₄. Puede utilizarse cualquier cantidad adecuada del ácido. Por ejemplo, pueden utilizarse de aproximadamente 0,1 a 5 equivalentes del ácido. Preferiblemente, se emplean de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 equivalentes del ácido. Aún más preferiblemente, se emplean de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 equivalentes del ácido. La cristalización puede llevarse a cabo en uno o más disolventes orgánicos adecuados. Los disolventes orgánicos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, acetona, DMF, DMSO y acetonitrilo. Preferiblemente, se emplean acetona o acetonitrilo para la cristalización. Alternativamente, la cristalización puede llevarse a cabo en una mezcla de un disolvente orgánico y agua. Por ejemplo, puede emplearse una mezcla de acetona/agua, DMF/agua, DMSO/agua y acetonitrilo/agua para la cristalización.



En la presente memoria también se describen nuevas formas cristalinas del compuesto de fórmula (V), por ejemplo, las Formas Cristalinas 1, 2a, 2b y 3, según se describe a continuación. El compuesto de fórmula (V) preparado según el procedimiento descrito en el documento US2009/0274713 es un sólido amorfo y es muy higroscópico. Las formas cristalinas 1, 2a, 2b y 3, particularmente, las formas cristalinas 1, 2a y 2b, son significativamente menos higroscópicas que el sólido amorfo.

Formas cristalinas del compuesto de fórmula (V)**Forma cristalina 1**

5 Al menos un porcentaje concreto en peso del compuesto de fórmula (V) es la Forma Cristalina 1 del compuesto. Los porcentajes en peso concretos incluyen 70 %, 72 %, 75 %, 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 100 % o un porcentaje entre 70 % y 100 %.

Tal como se emplea en la presente memoria, "cristalino" se refiere a un sólido que tiene una estructura química muy regular. Cuando un porcentaje en peso concreto del compuesto de fórmula (V) es una forma cristalina concreta, el resto es alguna combinación de la forma amorfa y/o una o más formas cristalinas distintas de la forma concreta que se especifica.

10 La Forma Cristalina 1 se caracteriza por el patrón de difracción de polvo de rayos X (XRPD) mostrado en la Figura 8 con los valores del ángulo 2θ y las intensidades relativas listadas en la Tabla 1, obtenidos empleando radiación de Cu K α . La Forma 1 puede caracterizarse por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 4,2, 12,6, 12,8, 13,8, 15, 20,1, 23, 25,5 y 37,5 °. Alternativamente, la Forma 1 puede caracterizarse por unos picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 12,6, 12,8, 15 y 23. Debe entenderse que un

15 ángulo 2θ especificado significa el valor especificado $\pm 0,1$ °.

Tabla 1. Picos característicos de la Forma 1.

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
4,2	100
12,6	31,1
12,8	22,1
13,8	10,2
15	20,8
16	10
18,7	29,4
18,9	24,4
19,4	15,9
20,1	12,2
21	13,6
22	15,9
23	19,1
23,6	12,9
24,5	11,9
25,5	14,6
25,7	17,2

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
27,5	12,2
27,8	9,5
29,1	9,8
29,4	14,3
37,5	11,6

Tal como se emplea en la presente memoria, "pico XRPD principal" se refiere a un pico XRPD con una intensidad relativa mayor del 10 %. La intensidad relativa se calcula como una proporción de la intensidad del pico del pico de interés frente a la intensidad del pico del pico más grande.

- 5 La Forma 1 puede caracterizarse por una única transición endotérmica a $99,7 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ en el perfil de calorimetría de barrido diferencial (DSC) mostrado en la Figura 9. El perfil representa gráficamente el flujo de calor como una función de la temperatura. El DSC se realiza en la muestra empleando una velocidad de barrido de 10 °C/min desde 25 °C a 240 °C .
- 10 La Forma Cristalina 1 también puede caracterizarse mediante el perfil de análisis gravimétrico térmico (TGA) mostrado en la Figura 9. El perfil representa gráficamente el porcentaje de pérdida de peso de la muestra como una función de la temperatura, siendo el cambio en la velocidad de temperatura de 10 °C/min desde la temperatura ambiente hasta 350 °C . El perfil muestra una pérdida de peso de aproximadamente $3,7 \%$ a medida que la temperatura de la muestra cambia de 40 °C a 200 °C , lo que indica que la Forma 1 es un monohidrato.
- 15 La Forma 1 también se caracteriza por el perfil de sorción de vapor gravitacional (GVS) mostrado en la Figura 10. El perfil muestra el cambio en peso de una muestra a medida que cambia la humedad relativa (HR) del entorno entre 0% y 90% a un intervalo de HR de 10% a 25 °C . El perfil de adsorción muestra una cantidad muy pequeña ($1,6\%$) de ganancia de peso entre 40% de HR y 90% de HR. El perfil de desorción muestra una pérdida de peso de $1,9 \%$ entre 90% de HR y 0% de HR, lo que indica que no se ha producido deshidratación.
- 20 La Forma 1 puede obtenerse mediante la cristalización del compuesto de fórmula (V) en una mezcla de un disolvente orgánico y agua. Los disolventes orgánicos adecuados son como se describió anteriormente. En particular, puede emplearse una mezcla de acetona y agua para la cristalización. La proporción en volumen de acetona y agua puede estar en el intervalo de 80:20 a 99:1. Preferiblemente, la proporción es de 95:5. La cristalización puede llevarse a cabo a temperatura reducida, preferiblemente a -20 °C .

Forma cristalina 2a

- 25 Al menos un porcentaje concreto en peso del compuesto de fórmula (V) puede ser la Forma Cristalina 2a del compuesto. Los porcentajes en peso concretos incluyen 70% , 72% , 75% , 77% , 80% , 82% , 85% , 87% , 88% , 89% , 90% , 91% , 92% , 93% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% , 99% , $99,5 \%$, $99,9 \%$, 100% o un porcentaje entre 70% y 100% .
- 30 La Forma Cristalina 2a se caracteriza por el patrón de difracción de polvo de rayos X (XRPD) mostrado en la Figura 11 con los valores del ángulo 2θ y las intensidades relativas listadas en la Tabla 2, obtenidos empleando radiación de Cu Kα. La Forma 2a puede caracterizarse por uno, dos, tres, cuatro o cinco picos XRPD principales en los ángulos 2θ de $8,6$, $11,9$, $16,5$ y 24 . O, la Forma 2a puede caracterizarse por unos picos XRPD principales en los ángulos 2θ de $11,9$, $16,4$ y 24 .

Tabla 2. Picos característicos de la Forma 2a

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
8,6	30,8
9	52

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
11,9	50,3
13,6	24,1
14,6	83,5
15,7	19,5
16,5	64,2
17,2	21,1
18	26
18,6	34,3
18,9	33,5
19,8	100
20,9	30,3
21,3	65
22,4	47,8
23,2	59,1
24	59,1
25,9	27,3
27,5	25,8
29,2	23,2
30,8	19,6

5 La Forma 2a puede caracterizarse por una única transición endotérmica a $201,9 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ en el perfil de calorimetría de barrido diferencial (DSC) mostrado en la Figura 121. La Forma 2a también puede caracterizarse mediante el perfil de análisis gravimétrico térmico (TGA) mostrado en la Figura 12. El perfil muestra una pérdida de peso de aproximadamente 0,9 % a medida que la temperatura de la muestra cambia de 40 °C a 90 °C , lo que indica que la Forma 2a es anhidra.

10 La Forma 2a también se caracteriza por el perfil de sorción de vapor gravitacional (GVS) mostrado en la Figura 13. El perfil de adsorción muestra una cantidad muy pequeña (1,8%) de ganancia de peso entre 40 % de HR y 90 % de HR, lo que indica que no se ha producido hidratación. El perfil de desorción muestra una pérdida de peso de 2,4 % entre 90 % de HR y 0 % de HR.

La Forma 2a puede prepararse mediante la cristalización del compuesto (**V**) en un disolvente o disolventes hidrófilos, según se describió anteriormente. La Forma 2a puede prepararse mediante cristalización en acetona a una temperatura reducida, tal como -20 °C .

La Forma 2a puede prepararse retirando el catión salino de una sal del compuesto (V), tal como una sal DIPEA, haciendo pasar la sal a través de una columna de intercambio catiónico o añadiendo un ácido. La posterior cristalización en un disolvente hidrófilo, tal como acetona o acetonitrilo, proporciona la Forma 2a.

Forma cristalina 3

5 Al menos un porcentaje concreto en peso del compuesto de fórmula (V) puede ser la forma cristalina 3 del compuesto. Los porcentajes en peso concretos incluyen 70 %, 72 %, 75 %, 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 100 % o un porcentaje entre 70% y 100%.

10 La Forma Cristalina 3 se caracteriza por el patrón de difracción de polvo de rayos X (XRPD) mostrado en la Figura 14 con los valores del ángulo 2θ y las intensidades relativas listadas en la Tabla 3, obtenidos empleando radiación de Cu K α . La Forma 3 puede caracterizarse por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 10,4, 11,3, 12,2, 14,7, 17,6, 22,5, 26,3, 27,2, 28,8 y 29,8 °. La Forma 3 puede caracterizarse por unos picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 10,4, 1,3, 12,2, 17,6, 22,5, 26,3, 27,2 y 28,8 °.

15 Tabla 3. Picos característicos de la Forma 3

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
9,3	30,8
10,4	23
11,3	19,6
12,2	16,8
14,6	61,9
14,7	24
16	19,8
17,6	59,6
17,9	58,7
18,4	66,1
21	100
21,9	29,8
22,5	32,6
23,5	24,1
24,5	16,4
24,6	26,9
26,3	27,1
27,2	54,6

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
27,6	18,2
28,8	35,4
29,8	25,3

5 La Forma 3 puede caracterizarse por transiciones endotérmicas a $45,2 \pm 0,5$ °C, $93,3 \pm 0,5$ °C, y $177,2 \pm 0,5$ °C en el perfil de calorimetría de barrido diferencial (DSC) mostrado en la Figura 15. La Forma 3 también puede caracterizarse mediante el perfil de análisis gravimétrico térmico (TGA) mostrado en la Figura 15. El perfil muestra una pérdida de peso de aproximadamente 4,48 % a medida que la temperatura de la muestra cambia de la temperatura ambiente a 180 °C, lo que indica que la Forma 3 es un monohidrato.

10 La Forma 3 también se caracteriza por el perfil de sorción de vapor gravitacional (GVS) mostrado en la Figura 16. El perfil de adsorción muestra una ganancia de peso de 25 % entre 40 % de HR y 90 % de HR. El perfil de desorción muestra una pérdida de peso de 29,4 % entre 90 % de HR y 0 % de HR. El segundo perfil de adsorción muestra una ganancia de peso de 0,4 % entre 0 % de HR y 40 % de HR, lo que indica que se ha producido una deshidratación durante la desorción.

15 La Forma 3 puede prepararse mediante la cristalización de una sal (por ejemplo, una sal DIPEA) en una mezcla de un disolvente orgánico y agua que contiene una pequeña cantidad de un ácido. Los disolventes orgánicos adecuados son como se describió anteriormente. El disolvente orgánico puede ser acetona. Preferiblemente, la proporción en volumen de acetona a agua es de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 99:1. Aún más preferiblemente, la proporción es de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 95:10. Puede utilizarse cualquiera de los ácidos adecuados descritos en la presente memoria. El ácido puede ser HCl o H₂SO₄. Puede utilizarse una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 equivalentes del ácido con relación a la sal. En particular, pueden utilizarse aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 equivalentes del ácido, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 equivalentes del ácido. La cristalización puede llevarse a cabo a una temperatura reducida descrita en la presente memoria, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C.

Forma cristalina 2b

25 La Forma Cristalina 3 puede convertirse en una forma cristalina anhidra, la Forma Cristalina 2b, mediante deshidratación o secado en vacío. La deshidratación puede llevarse a cabo a 0 % de HR empleando P₂O₅ como secante. O, la Forma Cristalina 2b puede prepararse secando la Forma Cristalina 3 en vacío a 30 °C durante 24 horas.

30 La Forma Cristalina 2b se caracteriza por el patrón de difracción de polvo de rayos X (XRPD) mostrado en la Figura 17 con los valores del ángulo 2θ y las intensidades relativas listadas en la Tabla 4, obtenidos empleando radiación de Cu Kα. En particular, la Forma 2b puede caracterizarse por uno, dos, tres, cuatro o cinco picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 8,5, 11,9, 16,4, 24 y 31,7 °. O, la Forma 2b puede caracterizarse por un pico XRPD principal en los ángulos 2θ de 31,7 °, y uno, dos, tres o cuatro picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 8,5, 11,9, 16,4 y 24 °. También particularmente, la Forma 2b puede caracterizarse por unos picos XRPD principales en los ángulos 2θ de 11,9, 16,4, 24 y 31,7 °.

Tabla 4. Picos característicos de la Forma 2b

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
8,5	33,2
9,1	61,8
11,9	70
13,5	17,4
14,4	74,6

Ángulo 2θ (°)	Intensidad %
15,5	16,3
16,4	74,9
17,1	15,7
18,1	24
18,5	18,2
19,1	53,2
19,6	72,3
21,1	54,6
22,2	35,2
23,3	97,7
24	60,3
25,8	21,4
27,6	36,6
29,3	21,4
30,6	13,8
31,7	100

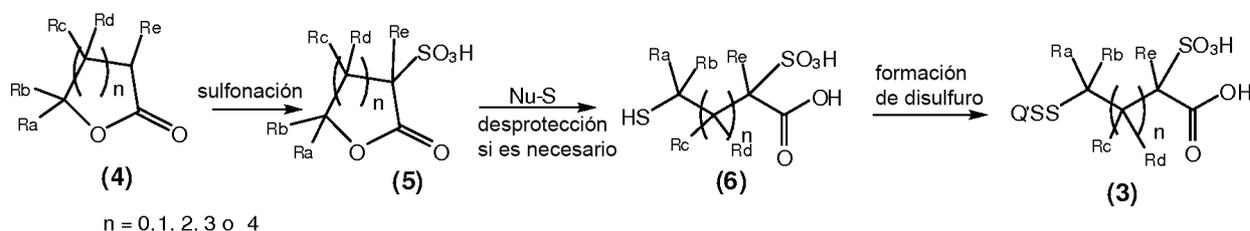
En la presente memoria también se describen métodos alternativos para preparar los compuestos de fórmula (III), en la que Q representa un resto disulfuro, o (IV). Estos proporcionan un proceso para la preparación de compuestos de fórmula (3) o (IV) que comprende:

- 5 a) hacer reaccionar una lactona de fórmula (4) con un agente sulfonante para formar un compuesto de fórmula (5) o una de sus sales. Preferiblemente, el agente sulfonante es ácido clorosulfónico o trióxido de azufre en su forma libre o formando un complejo, tal como un complejo con dimetilformamida, o una amina ejemplificada por piridina o trietilamina. Preferiblemente, el agente sulfonante es trióxido de azufre en su forma libre.
- 10 b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (5), o una de sus sales, con un nucleófilo que porta azufre, opcionalmente en presencia de una base y/o un ácido o un ácido de Lewis (Fujita et al., 1978, Tetrahedron Letters, 52, 5211; Kelly et al., 1977, Tetrahedron Letters, 49, 3859). Preferiblemente, el nucleófilo que contiene azufre se selecciona de sulfuro de hidrógeno, o una de sus sales, tiourea, ácido tioacético, 2-(trimetilsilil)etanotiol o tiofenol. Más preferiblemente, el nucleófilo que contiene azufre es tiourea, ácido tioacético o tiofenol. Puede utilizarse cualquier base, ácido o ácido de Lewis adecuado conocido en la técnica en los presentes métodos. Preferiblemente,
- 15 la base se selecciona de n-butil-litio, diisopropilamina de litio, diisopropiletilamina o trietilamina. Más preferiblemente, la base es n-butil-litio. En estos casos, la base, si se emplea, puede premezclarse con el nucleófilo que porta tiol, y después hacerse reaccionar con un compuesto de fórmula (5). Alternativamente, la base, si se usa, puede añadirse a una mezcla de un compuesto de fórmula (5) y el nucleófilo que porta tiol. Preferiblemente, la base se premezcla con el nucleófilo que porta tiol y después se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (5). Preferiblemente, el
- 20 ácido o el ácido de Lewis, si se usa, se selecciona de ácido 4-toluensulfónico, tricloruro de aluminio, trifluoruro de boro o tetracloruro de titanio. Más preferiblemente, el ácido o el ácido de Lewis, si se usa, es ácido 4-toluensulfónico o tricloruro de aluminio. Típicamente, estas reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente en disolventes,

tales como diclorometano o 1,2-dicloroetano cuando no se emplea una base fuerte. Cuando se emplea una base fuerte, las reacciones se realizan típicamente entre -40 y 25 °C.

c) Desprotección opcional para liberar el tiol libre. La desprotección puede llevarse a cabo por varios medios. Los tioésteres o sales de tiouronio pueden hidrolizarse con bases, tales como NaOH o Na₂CO₃ (Zervas et al., 1963, J. Am. Chem. Soc., 85, 1337). Los ésteres de trimetilsililetanol también pueden desprotegerse empleando agentes que contienen fluoruro, tales como fluoruro de hidrógeno o fluoruro de tetrabutilamonio (Hamm et al., 2004, Org. Lett., 6, 3817) y los aductos de tiofenol pueden desprotegerse mediante una electrolisis o mediante acetato de paladio (Chung et al., 2004, J. Chem. Soc., 126, 7386). Preferiblemente, la desprotección implica una hidrólisis con una base, tal como NaOH o KOH. Típicamente, dichas reacciones se llevan a cabo en una disolución acuosa de NaOH o KOH, opcionalmente mezclados con un disolvente miscible en agua, tal como metanol, etanol, THF, y a temperatura ambiente.

d) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (6), o una de sus sales, con un compuesto de disulfuro mixto para proporcionar el compuesto de fórmula (3) o (IV). Preferiblemente, el compuesto de disulfuro mixto se selecciona de 2,2'-ditiopiridina, 4,4'-ditiopiridina, 2,2'-ditiobis(5-piridina), 4-nitrofenildisulfuro, metantiosulfonato de S-metilo o disulfuro de dimetilo. Más preferiblemente, el compuesto de disulfuro mixto es 2,2'-ditiopiridina. En la técnica se conocen otros compuestos de disulfuro adecuados (véase, Aslam y Dent, 2000, Bioconjugation: Protein coupling techniques for the biomedical sciences, MacMillan, Londres)



Q' es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, orto o parnitrofenilo, dinitrofenilo, piridilo o nitropiridilo; Ra, Rb, Rc, Rd y Re, son cada uno independientemente, H o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, Ra, Rb, Rc, Rd y Re, son cada uno independientemente, H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Más preferiblemente, Ra, Rb, Rc, Rd y Re son todos H.

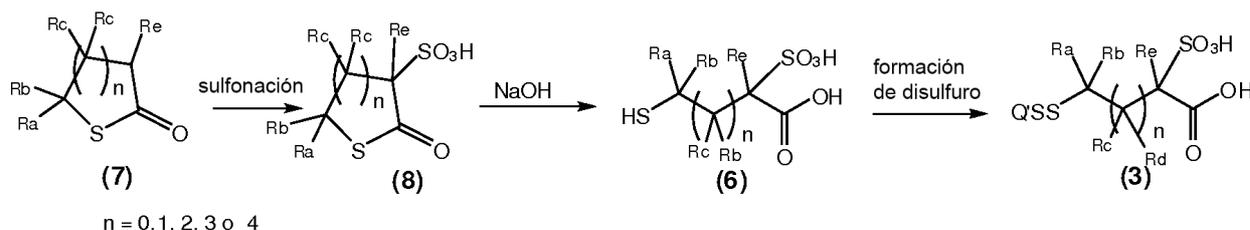
Un método más directo para preparar (3) o (IV) sería la alfa-sulfonación de una tiolactona, seguido de la hidrólisis del producto resultante y la reacción con un agente formador de disulfuro.

En la presente memoria también se describe un proceso para la preparación de compuestos de fórmula (3) o (IV) que comprende:

a) hacer reaccionar una tiolactona de fórmula (7) con un agente sulfonante para formar un compuesto de fórmula (8) o una de sus sales; Preferiblemente, el agente sulfonante es ácido clorosulfónico o trióxido de azufre en su forma libre o formando un complejo, tal como un complejo con dimetilformamida, o una amina ejemplificada por piridina o trietilamina. Preferiblemente, el agente sulfonante es trióxido de azufre en su forma libre;

b) hidrolizar el compuesto de fórmula (8), o una de sus sales, para formar un compuesto de fórmula (6) o una de sus sales. Preferiblemente, la hidrólisis se lleva a cabo en presencia de NaOH o KOH.

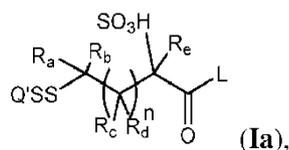
c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (6), o una de sus sales, con un compuesto de disulfuro para proporcionar el compuesto de fórmula (3) o una de sus sales. Preferiblemente, el compuesto de disulfuro se selecciona de 2,2'-ditiopiridina, 4,4'-ditiopiridina, 2,2'-ditiobis(5-piridina), 4-nitrofenildisulfuro, metantiosulfonato de S-metilo o disulfuro de dimetilo. Más preferiblemente, el compuesto de disulfuro es 2,2'-ditiopiridina.



Q' es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, orto o parnitrofenilo, dinitrofenilo, piridilo o nitropiridilo; Ra, Rb, Rc, Rd y Re, son cada uno independientemente, H o un alquilo lineal,

ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, R_a, R_b, R_c, R_d y R_e, son cada uno independientemente, H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Más preferiblemente, R_a, R_b, R_c, R_d y R_e son todos H.

- 5 El compuesto de fórmula (3) preparado según los procesos descritos en los métodos alternativos para preparar los compuestos de fórmula (III), en la que Q representa un resto disulfuro, o (IV) descritos inmediatamente más adelante Tabla 4 y los procesos para la preparación de los compuesto de fórmula (3) o (IV) descritos inmediatamente antes en la presente memoria puede reaccionar con un compuesto hidroxí o mercapto para formar un compuesto de fórmula (Ia):



- 10 o una de sus sales, en la que R_a, R_b, R_c, R_d, R_e, L y Q' son como se describió anteriormente.

Las sales de los compuestos descritos en la presente memoria que contienen un ácido carboxílico y/o un ácido sulfónico u otro grupo funcional ácido pueden prepararse haciendo reaccionar los compuestos con una base adecuada. La base adecuada incluye, pero no está limitada a, sales de metales alcalinos (en especial sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (en especial calcio y magnesio), sales de aluminio y sales de amonio, sales de tetraalquilamonio (tales como tetrametilamonio, tetraetilamonio), así como sales preparadas a partir de bases orgánicas, tales como trimetilamina, trietilamina y piridina. Preferiblemente, las sales son sales de Na⁺ o K⁺.

En particular, el resto de ácido sulfónico en los compuestos descritos en la presente memoria (por ejemplo, el compuesto de fórmula (I), (III) y (V)), puede existir como un ácido libre o como una de sus sales. Preferiblemente, un lote concreto del compuesto existiría sustancialmente como un ácido libre o en una única forma de sal, tal como Na⁺, K⁺, NMe₄⁺ o similar. Estas conversiones pueden realizarse por varios medios, que incluyen, pero no están limitados a, los siguientes. Un compuesto de fórmula (I), (III) o (V) puede disolverse o suspenderse con un tampón o una mezcla de tampón/disolvente que contiene el contraión de interés, para que los iones se intercambien. Después de esto, el compuesto deseado o una sal que porta el catión de interés (J) puede purificarse a partir de la mezcla de varias formas. Preferiblemente, cualquier cantidad de agua y disolvente se evapora y el compuesto deseado se disuelve en un disolvente orgánico y después se filtra para eliminar las sales inorgánicas. Esta filtración puede realizarse a través de un filtro normal o a través de una cantidad relativamente pequeña de un adyuvante de filtro, tal como, pero no limitado a, tierra de diatomeas, sílice o alúmina. Alternativamente, una disolución del compuesto de fórmula (I), (III) o (V) se eluye a través de un material de intercambio catiónico que se ha acondicionado con el catión de interés. Alternativamente, una disolución del compuesto puede mezclarse "de modo discontinuo" con un material de intercambio catiónico que se ha acondicionado con el catión de interés para completar el intercambio y después el material de intercambio iónico puede retirarse mediante filtración. Alternativamente, una disolución del compuesto puede capturarse sobre un material de intercambio aniónico y después liberarse eluyendo en un modo discontinuo o cromatográfico con un disolvente que contenga el catión deseado. La captura mediante una cromatografía de intercambio aniónico, seguido del desplazamiento con un catión de interés, es la forma más ventajosa cuando el catión es volátil, tal como trietilamina o diisopropiletilamina. Los ejemplos de materiales de intercambio iónico que son apropiados para esta aplicación son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen resinas Dowex, tales como Dowex 1, Dowex 50, resinas de DEAE o resinas de Amberlita.

En la presente memoria también se describen métodos para congelar una disolución de compuestos de fórmula (I), (III) o (V) y retirar el disolvente congelado mediante liofilización, también conocido como secado por congelación. Los disolventes o mezclas de disolventes que son adecuados para esta aplicación deben ser capaces de disolver los compuestos de fórmula (I), (III) o (V), y el disolvente o disolventes deben ser volátiles en las condiciones de vacío empleadas en el proceso de liofilización. El disolvente o sistema de disolventes también debe permanecer congelado durante el proceso de liofilización. Estos disolventes o sistemas de disolventes incluyen, pero no están limitados a, agua, 1,4-dioxano, terc-butanol, disoluciones de agua y acetonitrilo, disoluciones de agua y metanol, disoluciones de 1-4-dioxato y terc-butanol. Cada uno de estos disolventes individuales o mezclas de disolventes también pueden contener un aditivo ácido o básico que sea volátil bajo las condiciones de liofilización. Los aditivos ácidos o básicos que son adecuados para esta aplicación incluyen, pero no están limitados a, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, trietilamina o diisopropiletilamina.

Los esquemas para la síntesis de compuestos empleando los procesos descritos en la presente memoria se muestran en las Figuras 4-7. La Figura 4 muestra la síntesis de 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB). El ácido 4-(2'-piridilditio)butanoico se preparó como se ha descrito previamente (Widdison et al., 2006, J. Med. Chem., 49, 4392-44080). La sulfonación directa con ácido clorosulfónico en presencia de diisopropiletilamina (DIPEA) produjo la sulfonación en la posición C2 para proporcionar ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico. La reacción con N-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de EDC proporcionó el agente de reticulación sulfo-SPDB deseado.

Esta reacción de sulfonación directa puede utilizarse para producir una serie de ácidos α -sulfocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos. Se muestran ejemplos de la síntesis de una diversidad de compuestos de este tipo a partir de ácidos carboxílicos disponibles en el mercado en las Figuras 5-7. Estos compuestos de ácidos carboxílicos contienen un grupo a reactivo a tiol, tal como un disulfuro (Figura 5), una maleimida (Figura 6), un haloacetilo o un haloacetamido (Figura 7) para permitir la reacción con un agente que contiene tiol. Los ácidos sulfocarboxílicos resultantes pueden convertirse en ésteres activos empleando un compuesto de hidroxilo o mercapto en presencia de un agente de acoplamiento, tal como EDC, de una manera análoga al sulfo-SPDB mostrado en la Figura 4 y en los Ejemplos para proporcionar el agente de reticulación bifuncional. El resto de éster activo puede reaccionar con un agente de unión a células o un compuesto citotóxico o un marcador que porta un grupo amino o hidroxilo, mientras que el resto disulfuro, maleimida, haloacetilo o haloacetamido puede sufrir una reacción con un agente de unión a células o un compuesto citotóxico o un marcador que porta un grupo tiol, uniendo así el agente de unión a células con el compuesto citotóxico o marcador.

Definiciones

"**Alquilo lineal o ramificado**", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada saturado que tiene de uno a veinte átomos de carbono, preferiblemente de uno o diez átomos de carbono, más preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, 1-heptilo, 1-octilo, y similares.

"**Alqueno lineal o ramificado**" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a veinte átomos de carbono, preferiblemente de dos a diez átomos de carbono, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, en el que el radical alqueno incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans" o, alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, etileno o vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), y similares.

"**Alquino lineal o ramificado**" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o ramificado de dos a veinte átomos de carbono, preferiblemente de dos a diez átomos de carbono, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, etilino, propilino, 1-butilino, 2-butilino, 1-pentilino, 2-pentilino, 3-pentilino, hexilino, y similares.

Las expresiones "**alquilo cíclico**", "**alqueno cíclico**", "**alquino cíclico**", se refieren a un anillo saturado o parcialmente insaturado, no aromático monovalente que tiene de 3 a 10 átomos de carbono como anillo monocíclico, o de 7 a 10 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 10 átomos pueden disponerse, por ejemplo, como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos en el anillo pueden disponerse como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6], o como sistemas con puente, tal como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoililo, ciclododecilo, cicloundecilo, ciclododecilo, y similares.

El término "**cicloalquilo**" se refiere a un radical de anillo monocíclico saturado monovalente que tiene de 3 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, el cicloalquilo tiene de 3 a 7 átomos de carbono en el anillo. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

El término "**alquilo**" se refiere al alquilo lineal, ramificado o cíclico descrito anteriormente.

Los términos "**heterocicloalquilo**" se emplean de modo intercambiable en la presente memoria y se refieren a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más enlaces dobles y/o triples en el anillo) de 3 a 6 átomos en el anillo, en el que al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, y el resto de los átomos del anillo son C, en el que uno o más átomos del anillo está opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. Preferiblemente, el heterocicloalquilo es totalmente saturado. Un heterocicloalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 6 miembros en el anillo (de 1 a 3 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, y S). Los heterocicloalquilos son heterociclos descritos en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 a la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960), 82:5566.

Los ejemplos de heterocicloalquilos incluyen, pero no están limitados a, aziridina, pirrolidinilo, tetrahidrofurano, dihidrofurano, tetrahidrotienilo, tetrahidropirano, dihidropirano, tetrahidropirano, piperidino, morfolino,

tiorfolino, tiofanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofurano.

5 La expresión "**grupo heteroaromático**" se refiere a un radical aromático monovalente de anillos monocíclicos o bicíclicos de 5 a 12 miembros, que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, en el que uno o más átomos del anillo está opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. Preferiblemente, el grupo heteroaromático es un anillo monocíclico de 5 o 6 miembros. Los ejemplos de grupos heteroaromáticos son piridinilo (que incluye, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (que incluye, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo.

15 A modo de ejemplo, y no como limitación, los heterocicloalquilos o heteroaromáticos unidos por nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, en la posición 2 de un isoindol, o isoindolina, en la posición 4 de una morfolina, y en la posición 9 de un carbazol, u O-carbolina.

Los heteroátomos presentes en los grupos heteroaromáticos o heterocicloalquilos incluyen las formas oxidadas, tales como NO, SO, y SO₂.

20 A menos que se indique lo contrario, el grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo cíclico, ramificado o cíclico, cicloalquilo, heterocicloalquilo, fenilo, heteroaromático descrito en la presente memoria puede estar opcionalmente sustituido. Los sustituyentes adecuados incluyen, pero no están limitados a, halógeno, -OH, alquilo, alcoxi, haloalquilo, alcoxilalquilo, -NH₂, alquilamino, dialquilamino, en los que el grupo alquilo en los grupos sustituyentes es un alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo heteroaromático y el grupo fenilo también pueden estar sustituidos con grupos -CN y/o -NO₂.

25 El término "**alcoxi**" se refiere a un radical alquilo unido a través de un átomo de oxígeno conector. "Alcoxi" también puede representarse como -O-alquilo. Preferiblemente, el radical alquilo unido al átomo de oxígeno conector tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no están limitados a, metoxi, etoxi, propoxi y butoxi.

30 El término "**haloalquilo**" se refiere a un radical alquilo sustituido con uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) grupos halógeno. Preferiblemente, el grupo haloalquilo tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono.

El término "**alquilamino**" se refiere a un radical alquilo unido a través de un grupo conector -NH. "Alquilamino" también puede representarse como -NH-alquilo. Preferiblemente, el grupo alquilamino tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono.

35 El término "**dialquilamino**" se refiere a un grupo representado como -N(alquil)(alquilo). Preferiblemente, cada alquilo representado en -N(alquil)(alquilo) tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono.

El término "**halo**" o "**halógeno**" se refiere a F, Cl, Br o I.

40 El término péptido pretende incluir restos que comprenden dos o más aminoácidos secuencialmente unidos seleccionados de aminoácidos naturales o no naturales, que incluyen aminoácidos modificados, tales como, pero no limitados a, N-alquilo, N-arilo. Cada uno de dichos aminoácidos puede estar en la configuración L, en la configuración D o ser racémicos.

La expresión "**residuo de aminoácido**" se refiere a un aminoácido con los átomos de hidrógeno retirados de los grupos carboxi y amino terminales, es decir, -NHCH(R)C(=O)O-, R es el grupo de cadena lateral.

45 La expresión "**agente sulfonante**" se refiere a un agente que puede introducir un resto de ácido sulfónico en un compuesto. Los agentes sulfonantes que pueden utilizarse en los métodos descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica (véase la Patente de EEUU No. 1.926.422; W. Thaler, 1953, *Macromolecules*, 16, 623-628; Truce y Olson, 1953, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1651-1653) e incluyen trióxido de azufre en su forma libre o formando un complejo, tal como formando un complejo con dimetilformamida o dimetilacetamida, formando un complejo con una amina, tal como piridina o trietilamina. El agente sulfonante también puede ser un ácido halosulfónico, tal como ácido clorosulfónico y ácido fluorosulfónico. También pueden utilizarse sulfatos de alquilo, sulfitos de ácidos, sulfitos y cloruro de sulfurilo (Kharasch y Read, 1939, *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 3089-3092). También existe un informe que sugiere que las lactonas pueden sufrir una alfa-sulfonación con trióxido de azufre (Patente DE800410). La reacción de sulfonación descrita en la presente formando un complejo puede realizarse con disolventes, tales como 1,4-dioxano, THF, éter o poliéter, acetonitrilo, DMF, y disolventes halogenados. Preferiblemente, la reacción de sulfonación se realiza en disolventes halogenados, tales como diclorometano, cloroformo y 1,2-dicloroetano, más

preferiblemente en 1,2-dicloroetano. Aunque se prefiere que la sulfonación empleando ácido clorosulfónico se realice en un disolvente halogenado, también puede realizarse en ácido clorosulfónico sin disolvente. Típicamente, la sulfonación se realiza entre 25-110 °C cuando se emplea el ácido clorosulfónico como agente sulfonante. Preferiblemente, la sulfonación se realiza entre 50-100 °C, y más preferiblemente entre 70-90 °C. Cuando se emplea el trióxido de azufre como agente sulfonante, las reacciones se realizan típicamente a de -40 a 25 °C, preferiblemente de -20 a 5 °C.

La expresión "**reactivo de acoplamiento**" se refiere a un reactivo que activa el grupo ácido carboxílico hacia la formación de amidas y ésteres. Los reactivos de acoplamiento que pueden utilizarse en los procesos descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica. Los ejemplos de reactivos de acoplamiento incluyen, pero no están limitados a, *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). Típicamente, estos acoplamientos se realizan a temperatura ambiente en un disolvente aprótico, y varios disolventes adecuados que se emplean típicamente son diclorometano, tetrahidrofurano y dimetilformamida. Los métodos y las condiciones de acoplamiento son muy conocidos en la técnica (véase Benoiton, 2006, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, Florida)

La expresión "**un grupo reactivo a tiol**" representa un grupo que puede reaccionar con un grupo tiol en un compuesto que contiene tiol. Por ejemplo, un grupo reactivo a tiol puede ser un grupo disulfuro o una maleimida, haloacetilo o un haloacetamido, vinilsulfonas, vinilsulfonamidas, vinilpiridinas, oxiranos o aziridinas.

La expresión "**grupo reactivo a amina o hidroxilo**" representa un grupo éster o tioéster reactivo que contiene un grupo saliente que puede ser desplazado con facilidad por un grupo amina o un grupo hidroxilo. En la técnica se conocen grupos éster o tioéster reactivos. Por ejemplo, un éster reactivo puede ser un éster de *N*-hidroxisuccinimida, éster de *N*-hidroxisulfosuccinimida, éster de ftalimidilo, éster de nitrofenilo, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo, un éster de tiopiridilo y un éster de tionitrofenilo. En la técnica se conocen otros grupos reactivos para amina e hidroxilo (véase Aslam y Dent, 2000, Bioconjugation: Protein coupling techniques for the biomedical sciences, MacMillan, Londres).

La expresión "**nucleófilo que porta azufre**" se refiere a compuestos que portan un átomo de azufre en los que el átomo de azufre puede desplazar a un grupo saliente o provocar la apertura del anillo para producir un compuesto diferente. En el caso de una lactona, el ataque nucleófilo del azufre produce la apertura del anillo para generar un ácido carboxílico. Estas reacciones pueden realizarse a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas, tales como de 25 a 100 °C. Estas reacciones de desplazamiento pueden producirse en disolución sin aditivos o el desplazamiento puede requerir la ayuda de un ácido, un ácido de Lewis o una base. Los ejemplos de nucleófilos de azufre adecuados incluyen sulfuro de hidrógeno, hidrosulfuro de sodio, tiourea y ácido tioacético. Otros ejemplos y condiciones de reacción apropiadas son muy conocidos por los expertos en la técnica (véase, Cremllyn, 1996, An introduction to organosulfur chemistry, Wiley, Nueva York; Jerry March y Michael B. Smith, 2007, March's Advanced Organic Chemistry, Wiley, Nueva York).

El término "**sal**" se refiere a una sal preparada a partir de un compuesto de la presente invención que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional de ácido carboxílico o de ácido sulfónico, y una base inorgánica u orgánica. Las bases adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, hidróxidos de metales alcalinos, tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos, tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y cinc; amoniaco y aminas orgánicas, tales como mono, di, o trialkilaminas no sustituidas o sustituidas con hidroxilo; diciclohexilamina; tributilamina; trietilamina, diisopropiletilamina (DIPEA) o tributilamina, piridina; 4-alkilmorfolina, tal como 4-metilmorfolina; *N*-metil,*N*-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono, bis, o tris-(2-hidroxi-alkilo inferior-aminas), tales como mono, bis, o tris-(2-hidroxi-etil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, o tris-(hidroximetil)metilamina, *N,N*-di-alkilo inferior-*N*-(hidroxil-alkilo inferior)aminas, tales como *N,N*-dimetil-*N*-(2-hidroxi-etil)amina, o tri-(2-hidroxi-etil)amina; *N*-metil-*D*-glucamina; y aminoácidos, tales como arginina, lisina y similares. El término "sal" también se refiere a una sal preparada a partir de un compuesto de la presente invención que tiene un grupo funcional básico, tal como un grupo funcional amina, y un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable. Los ácidos adecuados incluyen, pero no están limitados a, sulfato de hidrógeno, ácido cítrico, ácido acético, ácido oxálico, ácido clorhídrico (HCl), bromuro de hidrógeno (HBr), yoduro de hidrógeno (HI), ácido nítrico, bisulfuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido bitartrático, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido maleico, ácido besílico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido glucarónico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido glutámico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, y ácido *p*-toluenosulfónico.

Tal como se emplea en la presente memoria, ClSO_3H puede referirse como "ácido clorosulfónico", "ácido clorosulfúrico" o "ácido sulfuroclorídico" u otros nombres que los expertos en la técnica reconocerían fácilmente que representan a ClSO_3H .

A menos que se indique lo contrario, las bases, los ácidos o los ácidos de Lewis que pueden utilizarse en los procesos descritos anteriormente son cualquier base adecuada conocida en la técnica. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, pero no están limitados a, *n*-butil-litio, diisopropilamina de litio, diisopropiletilamina, trietilamina, tributilamina. Los ejemplos de ácidos y ácidos de Lewis adecuados incluyen, pero no están limitados a, ácido

benzoesulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido sulfúrico, hidrobromuro, ácido trifluoroacético, tricloruro de aluminio y tetracloruro de titanio.

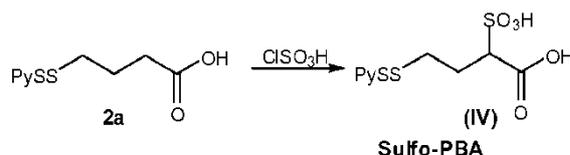
Ejemplos

Ejemplo 1

5 Método general para la α -sulfonación de ácidos carboxílicos

A una disolución agitada del compuesto ácido de ácido carboxílico en 1,2-dicloroetano anhidro (~ 0,2 M) se le añade ácido clorosulfónico (5 equivalentes) y la mezcla se agita en un baño de aceite a 75 °C durante 35 min. El baño de calentamiento se retira y se deja que la mezcla se enfríe hasta la temperatura ambiente y luego se vierte en hielo. La mezcla se lleva a pH 10-11 mediante la adición de NaOH al 10 % y se agita durante 10 min. Después, la disolución se ajusta a pH 5 con HCl al 5 % y la mezcla se transfiere a un embudo de separación. La capa orgánica se extrae con agua desionizada y las capas acuosas se combinan, se lavan con diclorometano y se concentran en vacío hasta que las sales inorgánicas comienzan a aparecer sobre la pared del matraz. El resto se diluye con CH₃CN y las dos capas formadas se transfieren a un embudo de separación. La capa inferior de color marrón claro se separa, se diluye con una pequeña cantidad de agua desionizada, CH₃CN y ácido fórmico (H₂O/CH₃CN/HCOOH, 10:1:1). Se carga en una columna C18 y se purifica (eluyendo con CH₃CN/H₂O:CH₃CN al 2 %, 0-5 minutos; CH₃CN del 2 % al 28 %, 5-20 minutos; CH₃CN al 28-90 %, 20-20:30 minutos; CH₃CN al 90 %, 20:30-25:30 minutos; CH₃CN al 90-2 %, 25:30-26 minutos; CH₃CN al 2%, 26-28 min) para proporcionar el ácido sulfo-SPDB 3 deseado como un aceite de color marrón claro. La capa superior de CH₃CN se concentra bajo presión reducida, se diluye con H₂O y HCOOH (10:1), se carga en una columna C18 y se eluye con CH₃CN/H₂O para proporcionar más cantidad del producto de ácido sulfonado.

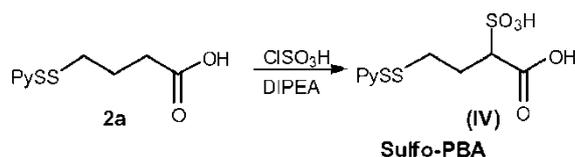
Ejemplo 2



Preparación del ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (IV) sin la adición de una base a la reacción

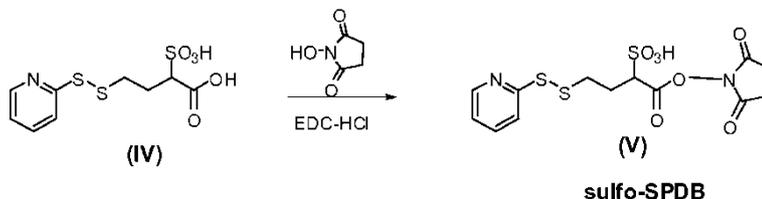
A una disolución agitada de ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (**2a**) (804 mg, 3,51 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (20 mL) se añadió ácido clorosulfónico (1,4 mL, 21 mmoles) rápidamente mediante una jeringa. La mezcla se calentó en un baño de aceite a 75 °C y se agitó a 73-78 °C durante 27 min. Se dejó que el baño de calentamiento y la mezcla de reacción se enfriaran hasta la temperatura ambiente y después la mezcla de reacción se vertió sobre hielo. La mezcla se llevó a pH 10 con NaOH al 10 % y se agitó durante 10 min. La disolución se ajustó a pH 5 con HCl al 5 % y la mezcla se transfirió a un embudo de separación. La capa orgánica inferior se separó y se extrajo con agua desionizada. Las capas acuosas se combinaron, se lavaron con diclorometano y se concentraron en vacío hasta que se obtuvo una suspensión de sólidos. La suspensión de sólidos se diluyó con acetonitrilo (100 mL) y se añadió una pequeña cantidad de agua desionizada hasta que todas las sales se disolvieron y se formaron dos capas. Las capas se transfirieron a un embudo de separación. La capa inferior de color marrón claro se aisló y se diluyó con agua desionizada, se tomó 1 mL de la disolución, se diluyó con CH₃CN (0,1 mL) y ácido fórmico (0,1 mL), y se cargó sobre una columna C18 de 10 micrómetros de 250 x 21 mm. Una elución con agua desionizada y acetonitrilo (acetonitrilo al 2 % 0-5 min; gradiente lineal de acetonitrilo al 2 %-acetonitrilo al 50 %, 5-23 min) proporcionó el ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (**IV**) deseado ($R_t = 11$ min). La evaporación del disolvente en vacío proporcionó 288 mg del producto deseado como un aceite de color marrón claro. La capa superior de CH₃CN era menos transparente que la capa inferior marrón, sin embargo, pudo aislarse más producto de la capa superior como sigue. El disolvente se eliminó en vacío, el residuo se recogió en CH₃CN, H₂O y HCOOH (10:10:1), y se cargó en una columna C18 de 10 micrómetros de 250 x 21 mm. La columna se eluyó con CH₃CN/H₂O (CH₃CN al 2 %, 0-5 minutos; gradiente lineal de CH₃CN del 2 % al 28 %, 5-20 minutos; CH₃CN al 28-90 %, 20-20:30 minutos; CH₃CN al 90 %, 20:30-25:30 minutos; CH₃CN al 90-2 %, 25:30-26 minutos; CH₃CN al 2 %, 26-28 minutos) para proporcionar 79 mg más de (**IV**). RMN de ¹H (400 Hz, D₂O): δ 8,55 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 8,31 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,71 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 3,83 (dd, J₁ = 9,2 Hz, J₂ = 5,2 Hz, 1H), 3,01-2,87 (m, 2H), 2,34-2,21 (m, 2H); RMN de ¹³C (100 Hz, D₂O): 170,8, 155,8, 145,6, 142,7, 125,8, 124,1, 64,0, 35,9, 27,3. MS (ESI) m/z 307,7 (M-1).

Ejemplo 3. Síntesis alternativa del ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (IV) con la adición de una base a la reacción



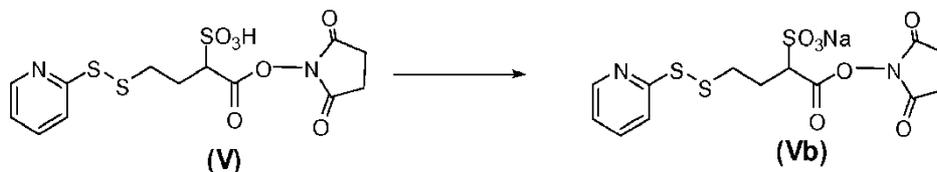
El ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (**2a**) (102 mg, 0,45 mmoles) se coevaporó con 1,2-dicloroetano (2 x 6 ml), se redisolvió en 6 ml de 1,2-dicloroetano y se colocó en un baño de aceite a 75 °C precalentado. Se añadió ácido clorosulfónico (100 μ L, 1,34 mmoles) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (117 μ L, 0,67 mmoles) y la mezcla se calentó con agitación a 75 °C durante 15 min. Después, se añadió otra parte alícuota de ácido clorosulfónico (80 μ L, 1,19 mmoles) y DIPEA (63 μ L, 0,36 mmoles) y la reacción se calentó a 75 °C durante 20 min más. Un análisis mediante HPLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió Na_2CO_3 acuoso concentrado hasta pH 11, se agitó durante 10 min, se neutralizó con H_3PO_4 hasta pH 7,0, se concentró y se purificó en una columna C18 eluida con un gradiente desde 100 % de agua (ácido acético al 0,5 %) hasta 75 % de agua (ácido acético al 0,5 %)/25 % de MeOH para rendir el ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (**IV**) (67 mg, 0,217 mmoles, 48,7 % de rendimiento). RMN de ^1H (D_2O) 8,41 (dd, 1H, J = 1,5, 4,9 Hz), 7,91-7,86 (m, 2H), 7,33-7,30 (m, 1H), 3,75 (dd, 1H, J = 5,1, 9,6), 3,00-2,94 (m, 1H), 2,86-2,79 (m, 1H), 2,33-2,26 (m, 2H); RMN de ^{13}C 176,60, 160,28, 150,60, 140,27, 123,39, 122,92, 69,07, 37,56, 29,45; ESI MS m/z- 307,8 (M-H).

Ejemplo 4. Preparación de 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (**V**) (sulfo-SPDB).



Se agitaron ácido 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoico (**IV**) (245 mg, 0,792 mmoles), EDC-HCl (345 mg, 2,222 mmoles) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (120 mg, 1,043 mmoles) en DMA (8 mL) durante la noche y se evaporó. El producto se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de MeOH/ CH_2Cl_2 /HOAc (de 1:10:0,5 % a 1:5:0,5 %) para rendir el 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (**V**) (sulfo-SPDB) (258 mg, 0,635 mmoles, 80 % de rendimiento).

Ejemplo 5. Preparación de la sal de sodio de 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (**Vb**) (sal de Na de sulfo-SPDB)



A una disolución de 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (24 mg, 0,059 mmoles) generada a partir de la cromatografía en columna de gel de sílice en DMA frío (0,5 mL) se añadió NaH_2PO_4 acuoso (1,0 M, 2 mL, pH 5,5). La mezcla se agitó en hielo durante 2-3 min y se evaporó en vacío. El sólido se suspendió en 3 ml de DMA (3 mL) y se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice eluyendo con DMA al 100 %. Las fracciones se reunieron, se evaporaron y después se cristalizaron con MeOH/EtOH/tolueno/hexano para rendir la sal de sodio del 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (18 mg, 0,042 mmoles, 71,2 % de rendimiento). RMN de ^1H (DMF-d_7) 8,49 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 7,88 (m, 2H), 7,27 (m, 1H), 4,05 (dd, 1H, J = 5,0, 9,4 Hz), 3,17 - 3,08 (m, 2H), 2,92 (s, 4H), 2,56 (m, 1H), 2,46 (m, 1H); RMN de ^{13}C 171,16, 166,61, 160,65, 150,66, 138,81, 122,14, 120,37, 62,61, 36,63, 26,60; ESI MS m/z- 404,7 (M Na).

Ejemplo 6. Preparación de 4-(2'-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (**V**) (sulfo-SPDB)

1. La síntesis de 2-sulfo-PBA:

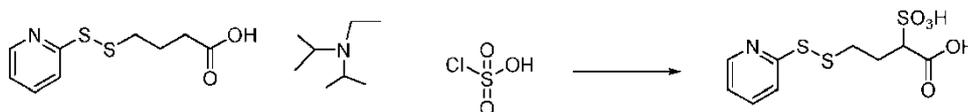
A una disolución del ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoico (725 mg, 3,16 mmoles) y 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (700 mg, 3,18 mmoles) en 15 ml de DCE (1,2-dicloroetano) a 75 °C se añadió ácido clorosulfúrico (300 μ L, 4,51 mmoles). Después de agitar durante 20 min a 75 °C se añadió otra porción de ácido clorosulfúrico (300 μ L, 4,51 mmoles). La mezcla se dejó en agitación a 75 °C durante 20 min, y después se añadió otra porción de ácido clorosulfúrico (200 μ L, 3,0 mmoles). De nuevo, 25 min después, se añadió la porción final de ácido clorosulfúrico (200 μ L, 3,0 mmoles) y la mezcla se agitó durante 25 min más. La mezcla se enfrió inmediatamente en un baño de hielo, se neutralizó con NaOH 1 M hasta pH ~ 7, se diluyó con EtOAc/hexano (1:1), se separó, y la capa orgánica se

lavó con agua pura (3 x 25 ml), mientras que cada capa acuosa generada se lavó con EtOAc/hexano (1:1, 35 ml). Las capas acuosas se combinaron, se acidificaron con HCl/HOAc hasta pH 3-4, se concentraron hasta ~ 10 ml, se diluyeron con MeCN (100 ml), se sonicaron (o se agitaron con rapidez) durante 1 h, se filtraron, y el sedimento resultante se lavó con agua/MeCN (1:10). La disolución se concentró entonces y se purificó en un cartucho de SiO₂ (40 g) eluyendo con agua/MeCN/HOAc (1:10:0,01). A las fracciones reunidas que contenían el producto se les añadió DMF (~ 5 ml) y se evaporaron hasta la sequedad para rendir el ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico (295 mg, 0,954 mmoles, 30,2 % de rendimiento).

2. La síntesis del conector sulfo-SPDB:

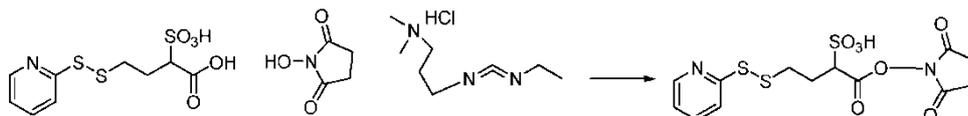
A una disolución del ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico (0,292 mg, 0,944 μ moles) en DMA (8 mL) se añadió 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (0,120 mg, 1,043 μ moles) y N1-((etilimino)metilen)-N3,N3-dimetilpropan-1,3-diamina (EDC, 0,647 mg, 4,17 μ moles). La mezcla de reacción se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó en un cartucho de SiO₂ (40 g) eluyendo con una mezcla de acetona/DCM/HOAc (4:1:0,01). Las fracciones que contenían el producto se reunieron, se evaporaron y se solidificaron con EtOH/Tol/hexano para rendir el ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-sulfónico (sulfo-SPDB, 0,270 mg, 0,664 μ moles, 70,4 % de rendimiento).

Ejemplo 7.

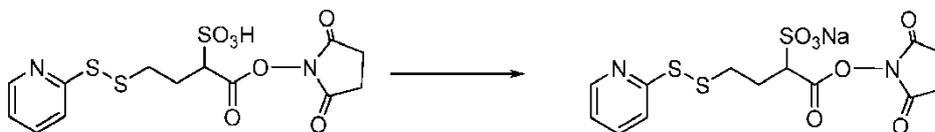


El ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoico (102 mg, 0,445 mmoles) se coevaporó con 1,2-dicloroetano (2 x 6 ml) (para eliminar la humedad) y se redisolvió en 6 ml de 1,2-dicloroetano. La disolución resultante se colocó entonces en un baño de aceite precalentado (75-80 °C). A esta disolución se añadió ácido sulfuroclorídico (100 μ L, ~ 3 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 5-8 min. Después, se añadió DIPEA (117 μ L, 1,5 eq.) (para precipitar el producto) y la mezcla resultante se agitó durante 5 min. Se añadió otra porción de ácido sulfuroclorídico (40 μ L, 1,33 eq.) y la mezcla se agitó durante ~ 15 min, seguido de la adición de DIPEA (63 μ L, 0,81 eq.) y se agitó durante 5 min. Se añadió una tercera porción de ácido sulfuroclorídico (40 μ L, 1,33 eq.) y la mezcla se agitó durante 15-20 min. La mezcla resultante se retiró del baño de aceite y se enfrió (en un baño de hielo). Se añadió NaOH acuoso (0,5 M) o Na₂CO₃ concentrado para aumentar el pH hasta ~ 12 y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. La fase orgánica se separó, se lavó con agua (2 x 10 ml), y se neutralizó con H₃PO₄ hasta pH 7. La fase orgánica se concentró entonces hasta ~ 5 ml y se acidificó con HCl hasta un pH ~ 4. El producto bruto se purificó haciéndolo pasar a través de una columna C-18 empleando un gradiente de elución de 100 % de agua (que contenía HAC al 0,5 %) hasta 75 % de agua (que contenía HAC al 0,5 %)/25 % de MeOH. Las fracciones que contenían el producto deseado (eluidas a 5-10 % de MeOH) se reunieron, y se evaporaron para rendir el ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico (67 mg, 0,217 mmoles, 48,7 % de rendimiento). RMN de ¹H (D₂O) 8,41 (dd, 1H, J = 1,5, 4,9 Hz), 7,89 (m, 2H), 7,31 (m, 1H), 3,75 (dd, 1H, J = 5,1, 9,6), 2,97 (m, 1H), 2,82 (m, 1H), 2,28 (m, 2H); RMN de ¹³C 176,60, 160,28, 150,60, 140,27, 123,39, 122,92, 69,07, 37,56, 29,45; ESI MS m/z- 307,8 (M-H).

Procedimiento alternativo: el ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoico (106 mg, 0,462 mmoles) se coevaporó con 1,2-dicloroetano (2 x 5 ml), se redisolvió en 5 ml de 1,2-dicloroetano y se colocó en un baño de aceite a 75 °C precalentado. A esta disolución se añadió ácido sulfuroclorídico (154 μ L, 2,311 mmoles) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (161 μ L, 0,924 mmoles). La mezcla se colocó en el baño de aceite a 75 °C precalentado durante 45 min. Se añadió otra porción de ácido sulfuroclorídico (45 μ L, 0,675 mmoles) y la reacción se calentó a 75 °C durante 1 hora más hasta que la reacción se completó (monitoreado mediante HPLC). A la mezcla se añadió Na₂CO₃ concentrado hasta un pH de 11. La mezcla resultante se agitó durante 10 min, se neutralizó con H₃PO₄ hasta pH 7,5 y se concentró. El producto bruto se purificó mediante HPLC en una columna C-18 eluyendo con un gradiente de 100 % de agua (HAC al 0,5 %) hasta 80 % de agua (HAC al 0,5 %)/20 % de MeOH para rendir el ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico (63 mg, 0,204 mmoles, 44,1 % de rendimiento).



Una mezcla del ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico (245 mg, 0,792 mmoles), N1-((etilimino)metilen)-N3,N3-dimetilpropan-1,3-diamina (345 mg, 2,222 mmoles) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (120 mg, 1,043 mmoles) se agitó en 8 ml de DMA durante la noche. La disolución resultante se evaporó y el residuo se purificó en una columna de sílice empleando MeOH/CH₂Cl₂ (de 1:10 a 1:5) que contenía ácido acético al 0,5 % como disolvente de elución, para rendir el ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-sulfónico (258 mg, 0,635 mmoles, 80 % de rendimiento).



Al ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-sulfónico (24 mg, 0,059 mmoles) generado a partir de la cromatografía en columna de SiO₂ (eluido con 1:10:0,5 % a 1:5:0,5 % de MeOH/CH₂Cl₂/HAc) se añadieron 0,5 ml de DMA frío y 2 ml de NaH₂PO₄ 1,0 M, pH 5,5. La mezcla se agitó en un baño de hielo durante 2-3 min, y se evaporó empleando una bomba de aceite (sin calor, estilo de secado libre). El sólido resultante se suspendió en 3 ml de DMA y se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice eluyendo con DMA al 100 %. Las fracciones se reunieron, se evaporaron y después se cristalizaron con MeOH/EtOH/tolueno/hexano para rendir el 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-sulfonato de sodio (18 mg, 0,042 mmoles, 71,2 % de rendimiento). RMN de ¹H (DMF-d₇) 8,49 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 7,88 (m, 2H), 7,27 (m, 1H), 4,05 (dd, 1H, J = 5,0, 9,4 Hz), 3,17 - 3,08 (m, 2H), 2,92 (s, 4H), 2,56 (m, 1H), 2,46 (m, 1H); RMN de ¹³C 171,16, 166,61, 160,65, 150,66, 138,81, 122,14, 120,37, 62,61, 36,63, 26,60; ESI MS m/z- 404,7 (M Na).

Ejemplo 8. Instrumentos y métodos

1. Difracción de polvo de rayos X (XRPD)

Los patrones de difracción de polvo de rayos X se recogieron en un difractómetro Bruker D8 empleando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro de θ -2 θ , y divergencia de V4 y ranuras receptoras, un monocromador Ge y un detector Lynxeye. Se comprueba la actuación del instrumento empleando un estándar Corundum certificado (NIST 1976). El software empleado para la recogida de datos fue Diffrac Plus XRD Commander v2.5.0, y los datos se analizaron y se presentaron empleando Diffrac Plus EVA v11.0.0.2 o v13.0.0.2.

Las muestras se ensayaron a condiciones ambientales como especímenes en placa plana empleando polvo tal como se recibieron. La muestra se introdujo con cuidado en una cavidad excavada en una oblea de silicio pulida de fondo cero (510). La muestra se hizo rotar en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recogida de datos son:

- Amplitud angular: de 2 a 42 °2 θ
- Tamaño del paso: 0,05 °2 θ
- Tiempo de recolección: 0,5 s/etapa

Para la Forma Cristalina 3, la amplitud angular fue de 3 a 30 °2 θ .

2. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Los datos de DSC se recogieron en un Mettler DSC 823e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para la energía y la temperatura empleando indio certificado. Típicamente, 0,5-2,0 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con agujeros de alfiler, se calentaron a 10 °C/min desde 25 °C a 240 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento y de análisis de los datos fue STARe v9.20.

3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los datos de TGA se recogieron en un Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para la temperatura empleando indio certificado. Típicamente, 5-10 mg de cada muestra se cargaron en un crisol de aluminio prepesado y se calentaron a 10 °C/min desde la temperatura ambiente hasta 350 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento y de análisis de los datos fue STARe v9.20.

4. Sorción de vapor gravimétrica (GVS)

Se obtuvieron las isotermas de sorción empleando un analizador de sorción de humedad SMS DVS Intrinsic, controlado mediante el software DVS Intrinsic Control v1.0.0.30. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25 °C por medio de los controles del instrumento. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 200 ml/min. La humedad relativa se midió mediante una sonda Rotronic calibrada (intervalo dinámico de 1,0-100 % de HR) colocada cerca de la muestra. El cambio de peso (relajación de masa) de la muestra como una función del % de HR fue monitorizado constantemente con una microbalanza (precisión \pm 0,005 mg).

Típicamente, se colocaron 10 mg de la muestra en un cestillo de malla de acero inoxidable tarado en condiciones ambientales. La muestra se cargó y se descargó a una HR del 40 % y 25 °C (condiciones ambientales típicas). Se realizó una isoterma de sorción de humedad tal como se indica más adelante (2 barridos producen 1 ciclo completo).

La isoterma estándar se realizó a 25 °C a intervalos de 10 % de HR a lo largo de una amplitud de 0-90 % de HR. El análisis de los datos se realizó en Microsoft Excel empleando DVS Analysis Suite v6.0.0.7.

Tabla 5. Parámetros del método para los experimentos de SMS DVS Intrinsic

Parámetros	Valores
Adsorción - Barrido 1	40-90
Desorción/Adsorción - Barrido 2	90-0,0-40
Intervalos (% de HR)	10
Número de barridos	2
Caudal (ml/min)	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C/min)	0,2
Tiempo de sorción (horas)	6 horas de temporización

5 La muestra se recuperó después de completar la isoterma y se volvió a analizar mediante XRPD.

5. *Cromatografía iónica (IC)*

10 Los datos se recogieron en un Metrohm 861 Advanced Compact IC (para los aniones) empleando el software IC Net v2.3. Las muestras pesadas con precisión se prepararon como disoluciones madre en una disolución para disolución apropiada y se diluyeron de modo apropiado antes del ensayo. Se logró la cuantificación mediante la comparación con disoluciones estándar de concentración conocida del ion que se está analizando.

Tabla 6. Parámetros del método IC para la cromatografía aniónica

Tipo de método	Intercambio aniónico
Columna	Metrosep A Supp 5 - 250 (4,0 x 250 mm)
Temperatura de la columna (°C)	Ambiente
Inyección (µl)	10
Detección	Detector de conductividad
Caudal (ml/min)	0,7
Eluyente	carbonato de sodio 3,2 mM, hidrógenocarbonato de sodio 1,0 mM en acetona acuosa al 5 %

Ejemplo 9. Procedimientos de cristalización para las Formas Cristalinas 1, 2a, 2b y 3

1. *Forma Cristalina 1*

15 Se suspendieron 531 mg de la sal DIPEA de sulfo-SPDB (sulfo-SPDB•0,6DIPEA) en 1 ml de acetona/H₂O (95/5 v/v) y se agitó magnéticamente a aproximadamente -20 °C durante 16 horas. La muestra se filtró en un Whatman

Autocup 0,45 µm y se lavó con 2 ml de acetona. La muestra se secó a temperatura ambiente durante 6 horas y se pesó. Se cristalizaron 113 mg de la Forma Cristalina 1 (rendimiento: 35 %).

2. Forma Cristalina 2a

a) Eliminación de DIPEA de la sal DIPEA de sulfo-SPDB empleando un medio de intercambio catiónico.

- 5 Se obtuvieron 1,09 g de la Forma Cristalina 1 a partir de la cristalización de 5,92 g de la sal DIPEA de sulfo-SPDB (sulfo-SPDB•0,6DIPEA) en 20 ml de acetona a aproximadamente -20 °C. La Forma Cristalina 1 se filtró (rendimiento: 29 %) y el licor se recuperó cuidadosamente (licor 1).

10 El licor 1 se concentró bajo presión reducida para rendir 4,84 g de la sal DIPEA de sulfo-SPDB amorfa. La sal se disolvió en 50 ml de acetonitrilo y se eluyó en 13,7 g de Amberlyst® 15 (Sigma-Aldrich, 216380 - seco, humedad ≤1,5 %, 8 eq.) con aproximadamente 220 ml de acetonitrilo (licor 2). La resina se había lavado y equilibrado inicialmente en acetonitrilo y agua y después se había equilibrado con acetonitrilo antes del uso.

El licor 2 se concentró bajo presión reducida para proporcionar 1,37 g de sulfo-SPDB amorfo (rendimiento: 37 %).

b) Procedimiento de cristalización

- 15 El sulfo-SPDB amorfo (1,37 g) se diluyó en 10 ml de acetona, se sembró con 21 mg de la Forma Cristalina 1 y se colocó bajo agitación magnética a -20 °C durante 3 horas. La muestra se filtró en un Whatman Autocup 0,45 µm y el vial se lavó con 150 ml de acetona y 150 ml de TBME. La muestra se secó a temperatura ambiente durante 16 horas y se pesó. Se recuperaron 722 mg de la Forma Cristalina 2a (rendimiento: 64 %).

3. Forma Cristalina 3

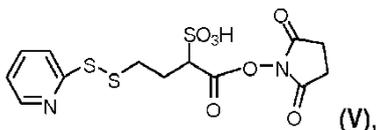
- 20 Se suspendieron 79 mg de la sal DIPEA de sulfo-SPDB (sulfo-SPDB•0,6DIPEA) suministrada en 200 µl de acetona/H₂O (90/10 v/v). Se añadieron 110 µl de una disolución madre de HCl en acetona/H₂O (90/10) v/v (1,0 eq.) a la suspensión a temperatura ambiente. Se observó que la muestra se convertía en una suspensión clara y se colocó bajo agitación magnética durante 16 horas a -20 °C. La muestra se filtró en un Whatman Autocup 0,45 µm y se lavó con 1 ml de acetona. La muestra se secó a temperatura ambiente durante 6 horas y se pesó. Se recuperaron 43 mg de la Forma Cristalina 3 (rendimiento: 84 %).

- 25 Ejemplo 10. Preparación de la Forma Cristalina 2b a partir de la Forma Cristalina 3

También se obtuvo la Forma Cristalina 2b a partir de la Forma Cristalina 3 mediante deshidratación a 0 % de HR empleando P₂O₅ como secante o secando en vacío a 30 °C durante 24 horas.

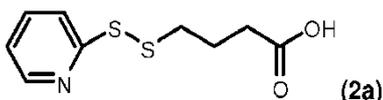
REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un compuesto representado por la fórmula (V):

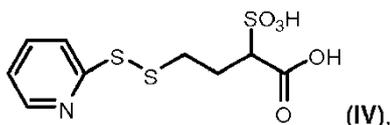


que comprende las etapas de:

5 a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (2a):



o una de sus sales, con un agente sulfonante para formar un compuesto de fórmula (IV):



o una de sus sales;

10 b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IV), o una de sus sales, con N-hidroxisuccinimida en presencia de una base para formar una sal del compuesto de fórmula (V); y

(c) purificar la sal del compuesto de fórmula (V), mediante cristalización de la sal del compuesto de fórmula (V) en un disolvente orgánico o una mezcla de un disolvente orgánico y agua en presencia de un ácido para formar la forma neutra del compuesto de fórmula (V).

15 2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el agente sulfonante es ácido clorosulfónico o trióxido de azufre.

3. El proceso de la reivindicación 1, en el que el agente sulfonante es ácido clorosulfónico.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la reacción de sulfonación se lleva a cabo en presencia de PySSPy.

5. El proceso de la reivindicación 4, en el que están presentes aproximadamente 0,5 equivalentes de PySSPy.

20 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la reacción entre el compuesto de fórmula (IV) y N-hidroxisuccinimida se lleva a cabo en presencia de un agente de acoplamiento.

7. El proceso de la reivindicación 6, en el que el agente de acoplamiento se selecciona de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), y 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ).

25 8. El proceso de la reivindicación 7, en el que el agente de acoplamiento es EDC.

9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la base es diisopropiletilamina (DIPEA).

10. El proceso de la reivindicación 1, en el que el proceso comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (2a) o una de sus sales con ácido clorosulfónico para formar el compuesto de fórmula (IV); y

30 b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IV) con N-hidroxisuccinimida en presencia de EDC para formar el compuesto de fórmula (V).

11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el ácido es HCl o H₂SO₄.

12. El proceso de la reivindicación 11, en el que el ácido es HCl.

35 13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la cristalización se lleva a cabo en una mezcla de un disolvente orgánico y agua.

14. El proceso de la reivindicación 13, en el que la mezcla de un disolvente orgánico y agua es acetona/agua, DMF/agua, DMSO/agua o acetonitrilo/agua.

Figura 1. Estructuras de agentes de reticulación no cargados representativos (TÉCNICA ANTERIOR)

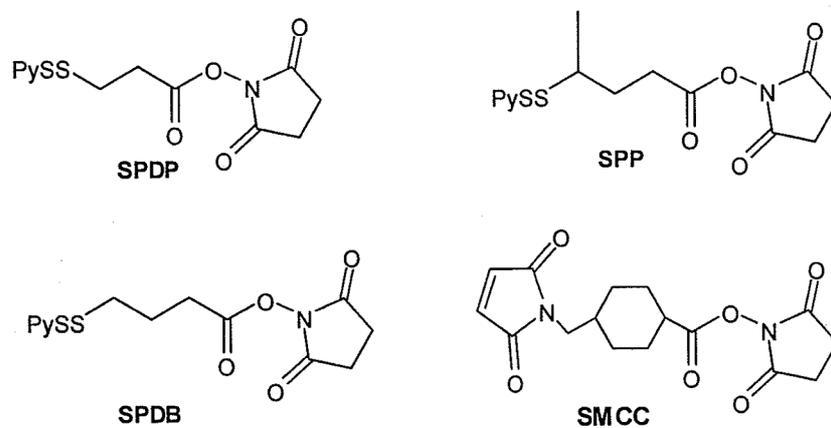


Figura 2. Estructura de sulfo-SPDB y de conjugado de anticuerpo-fármaco

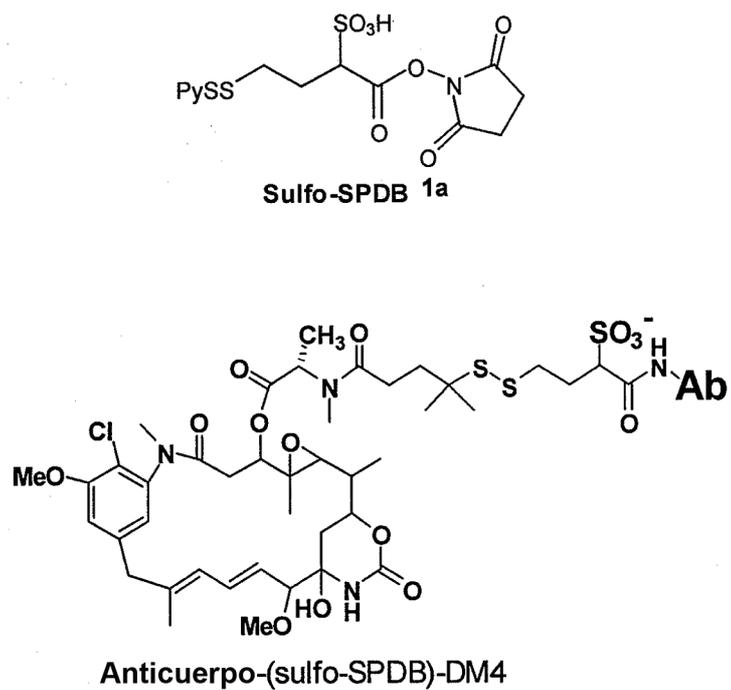
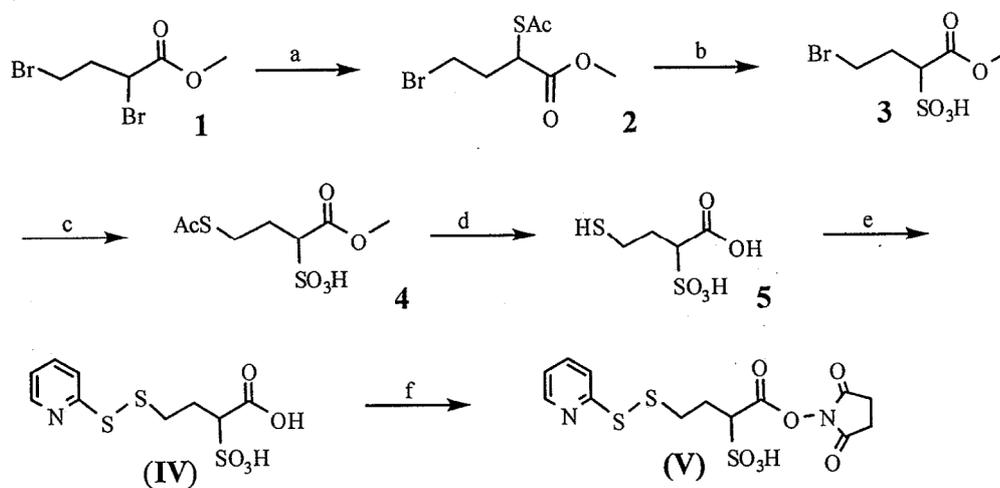


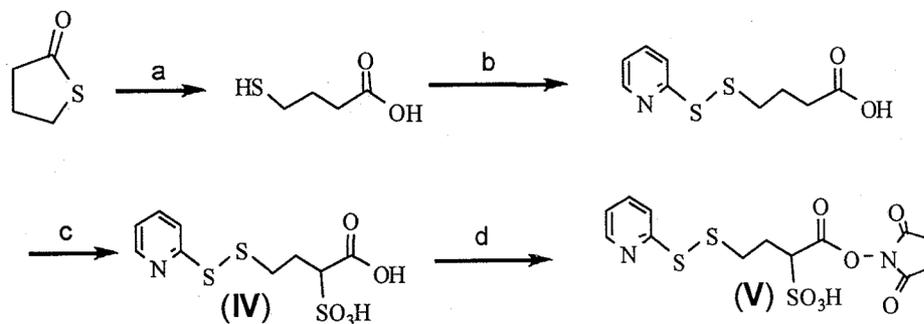
Figura 3. Síntesis de sulfo-SPDB (TÉCNICA ANTERIOR)



Condiciones: (a) HSac, DIPEA, THF, -20 °C; (b) H₂O₂/HOAc; (c) HSac, DIPEA, DMA; (d) NaOH; (e) (SPy)₂, pH 7,5; (f) NHS, EDC, DMA, 82 %.

Figura 4. Nueva síntesis de sulfo-SPDB

a)

Condiciones: (a) NaOH; (b) PySSPy; (c) ClSO₃H, ClCH₂CH₂Cl +/- base; (d) NHS, EDC

b)

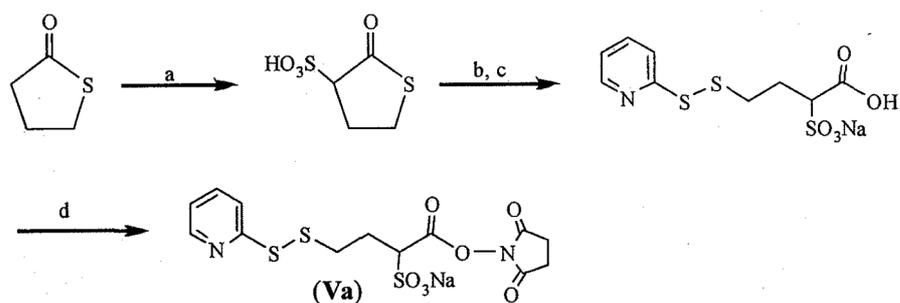
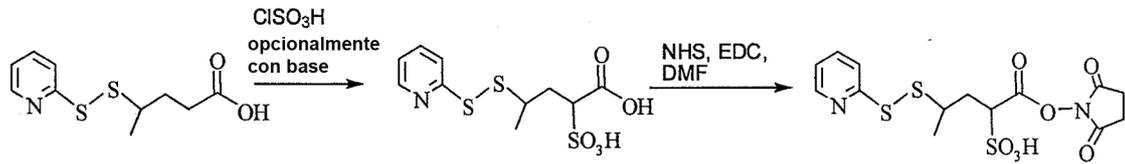
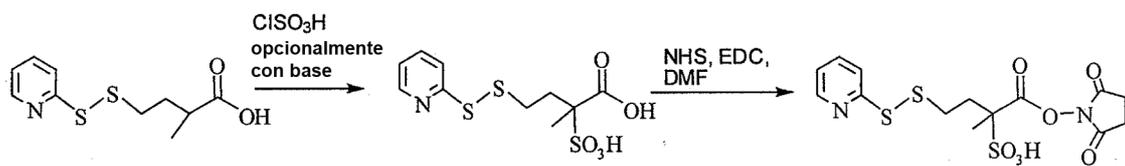
Condiciones: (a) ClSO₃H/DIPEA; (b) NaOH 0,5 M; (c) pH 7, PySSPy; (d) NHS, EDC, DMA

Figura 5. Síntesis de agentes de reticulación que contienen disulfuro

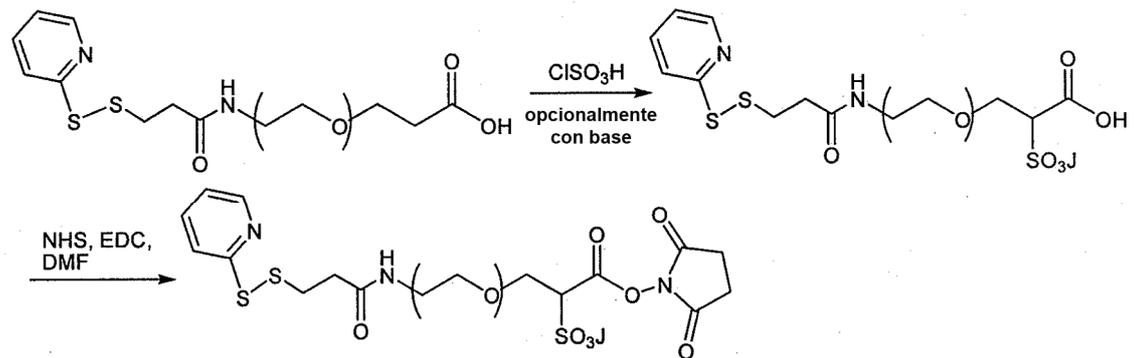
a)



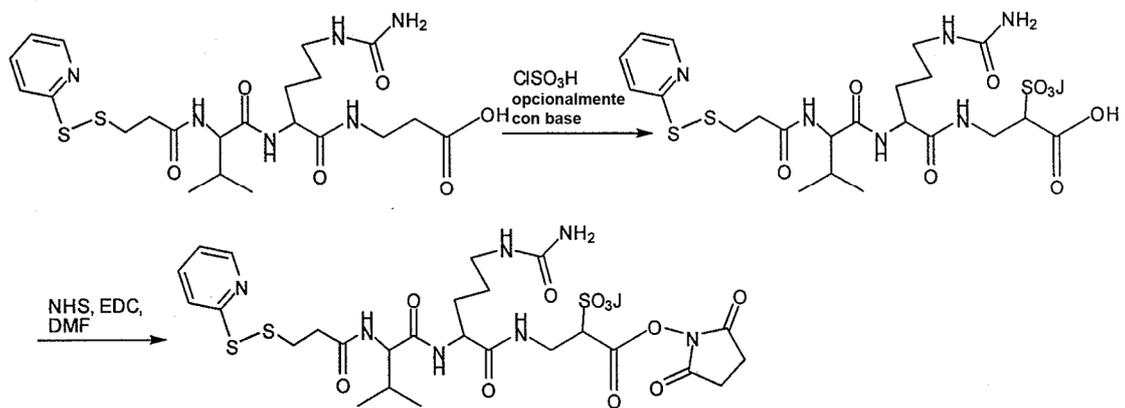
b)



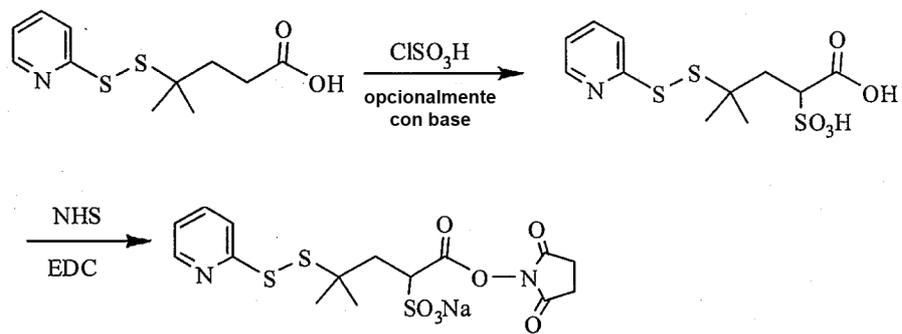
c)



d)



e)



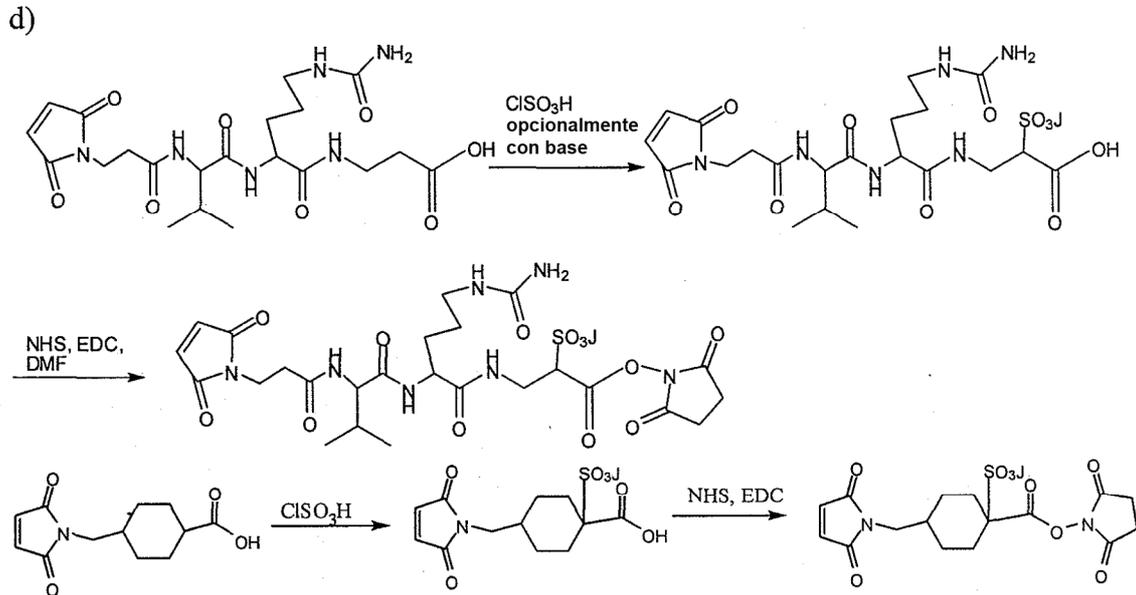
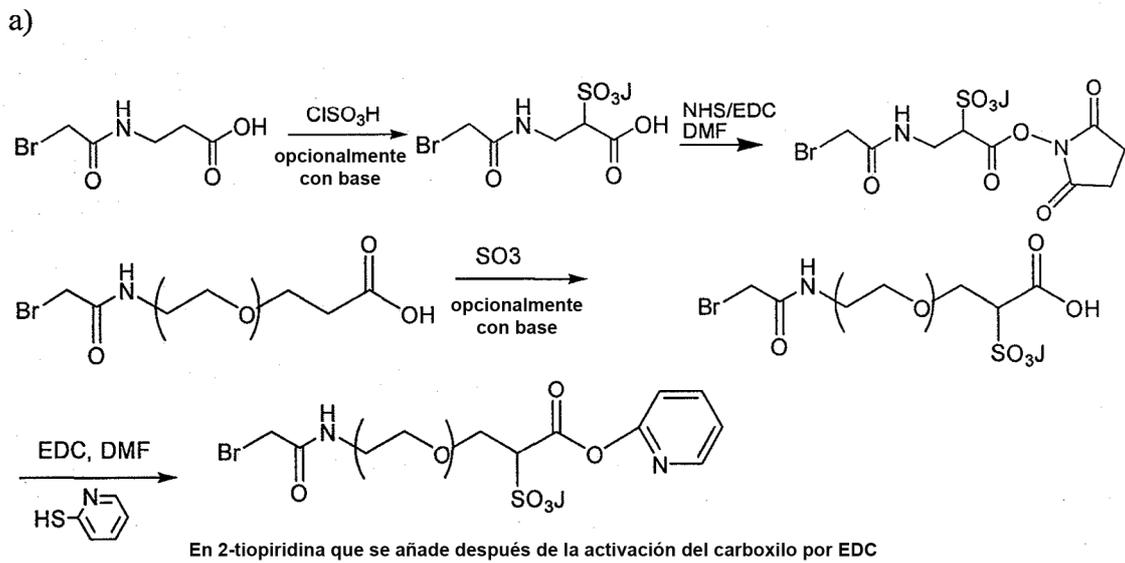


Figura 7. Síntesis de agentes de reticulación basados en haloacetamido



b)

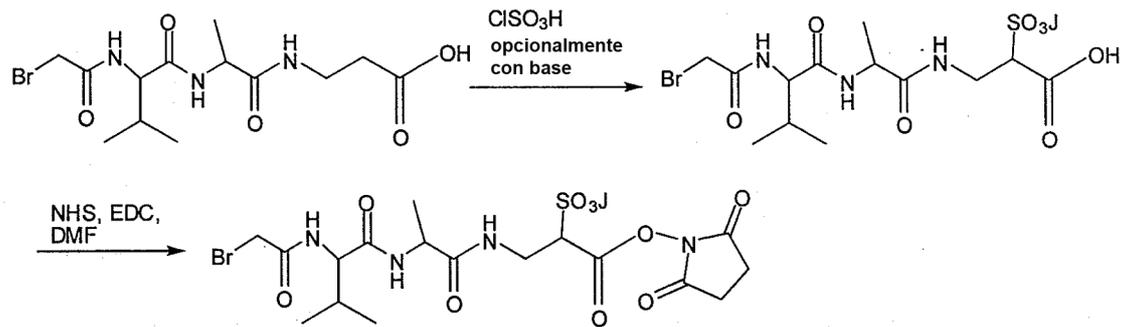


Figura 8.

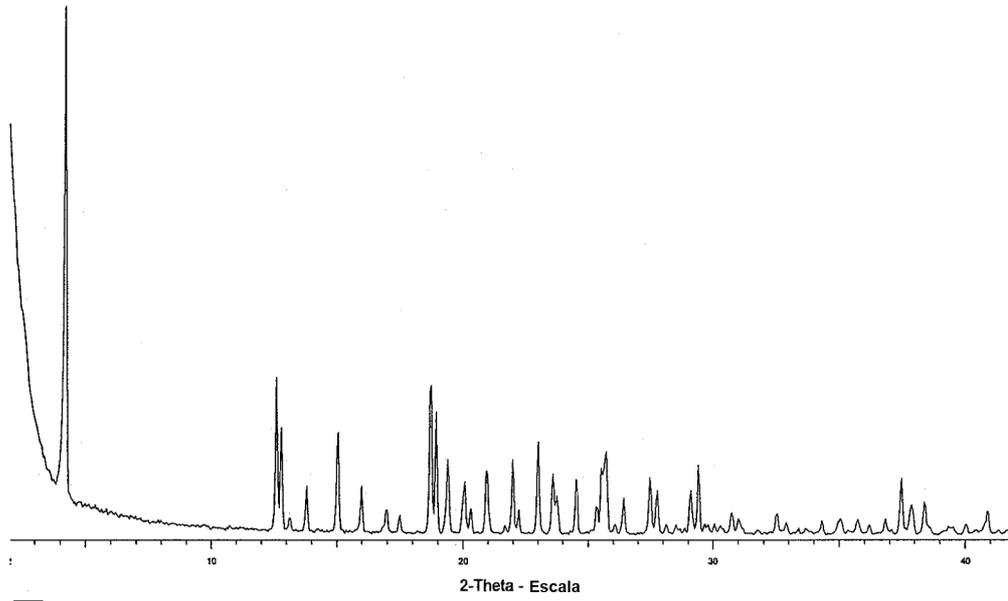
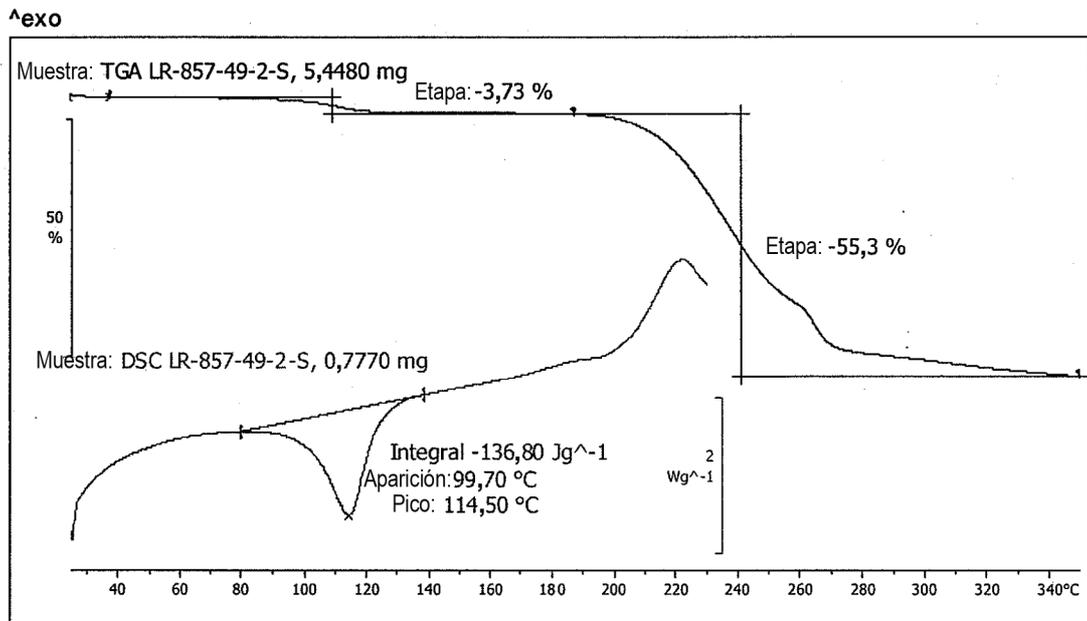


Figura 9.



Lab: LabUser

STAR^e SW 9.20

Figura 10.

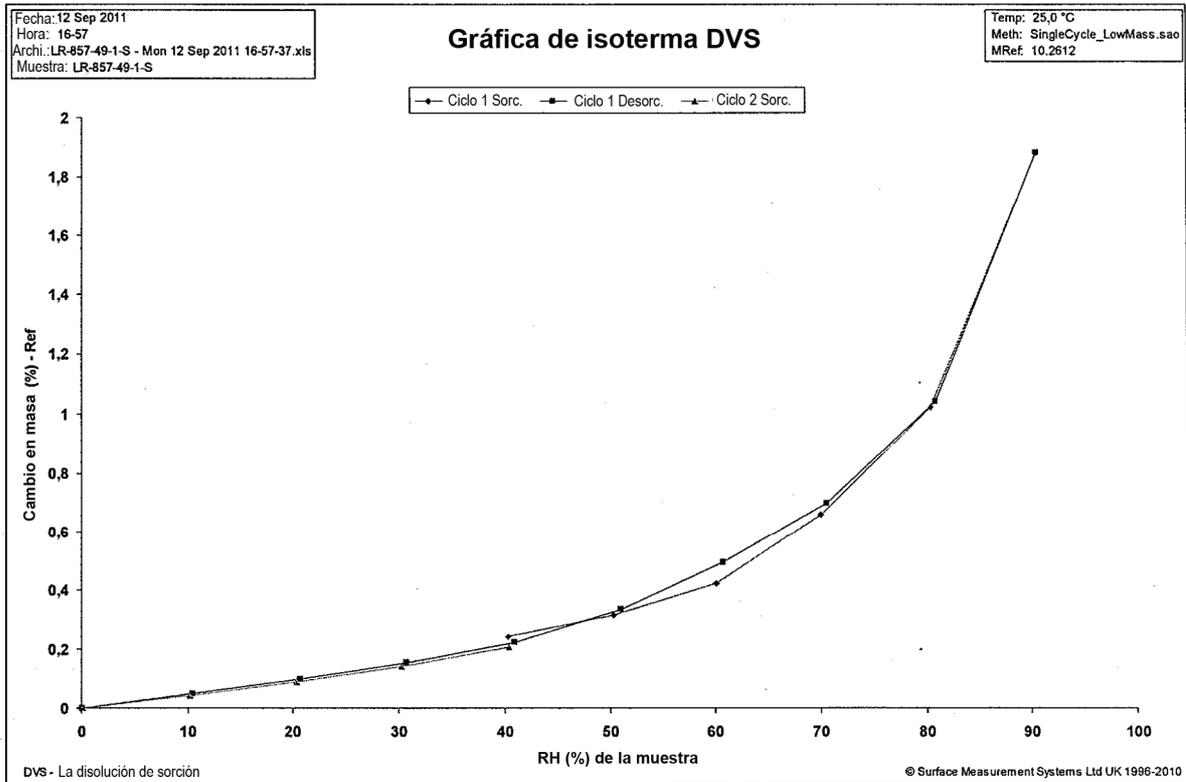


Figura 11.

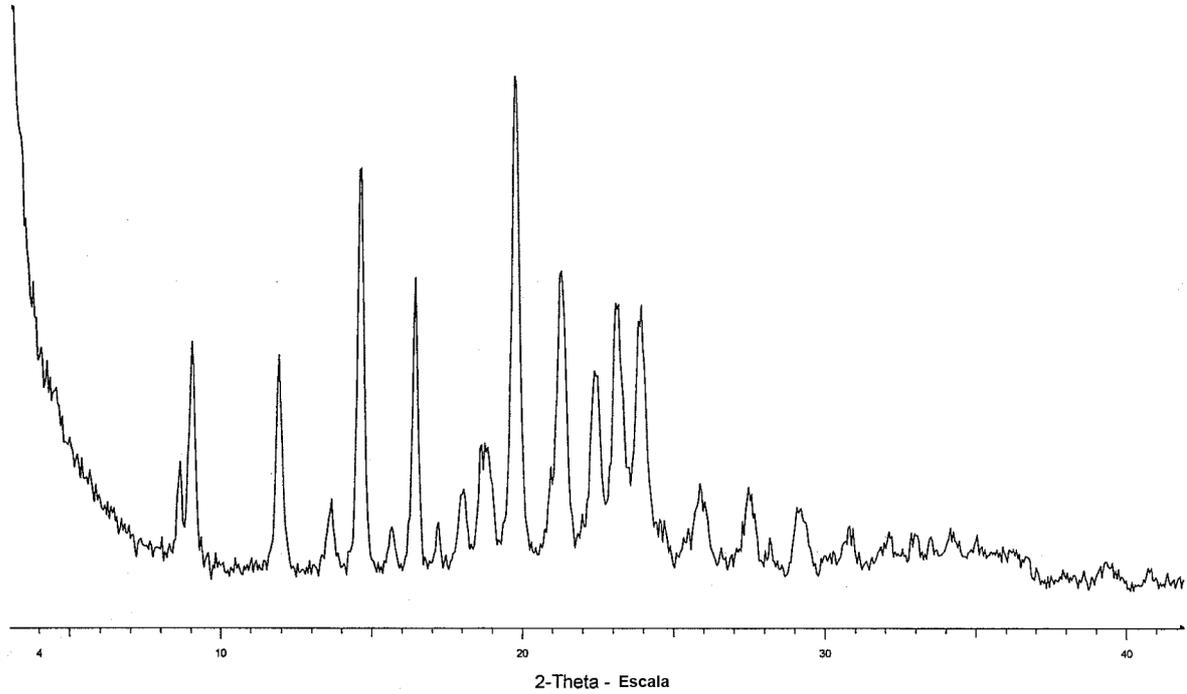


Figura 12.

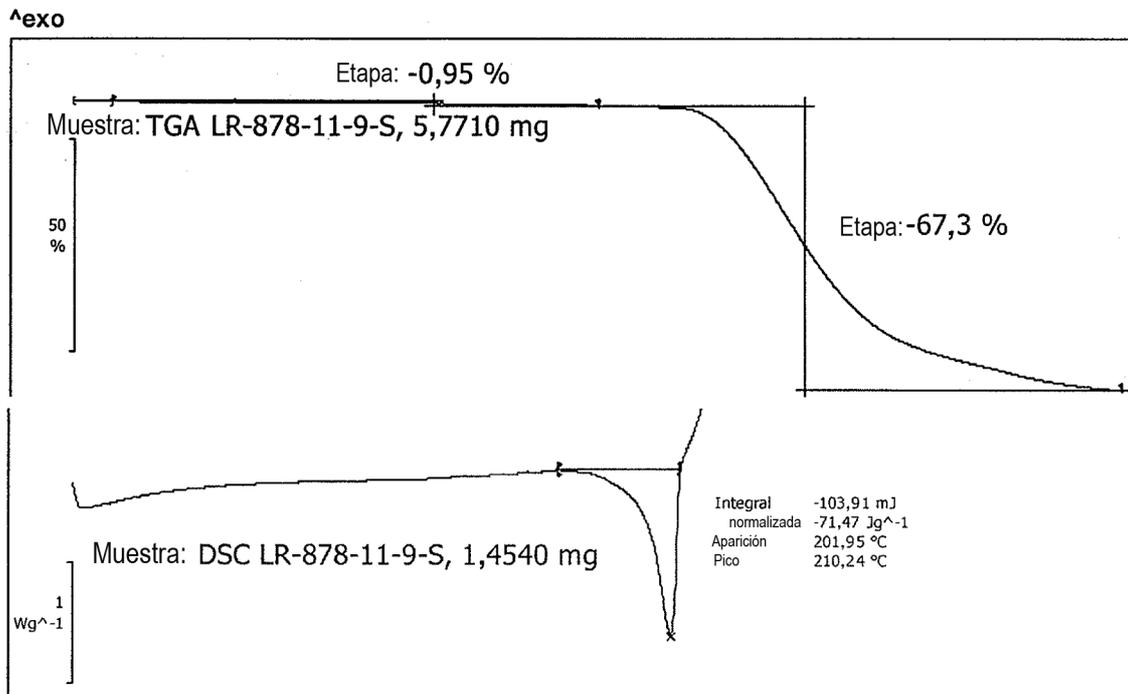


Figura 13.

