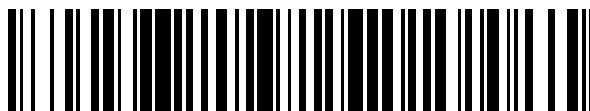


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 019**

51 Int. Cl.:

C07C 319/20 (2006.01)

C07C 323/60 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2008** **E 12159159 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 2465541**

54 Título: **Procedimientos mejorados de fabricación de hidrazidas**

30 Prioridad:

22.05.2007 US 939529 P

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

16.10.2018

73 Titular/es:

WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

CHIARELLO, GEORGE, A. y
SAHLI, AYMAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 686 019 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos mejorados de fabricación de hidrazidas

Campo de la invención

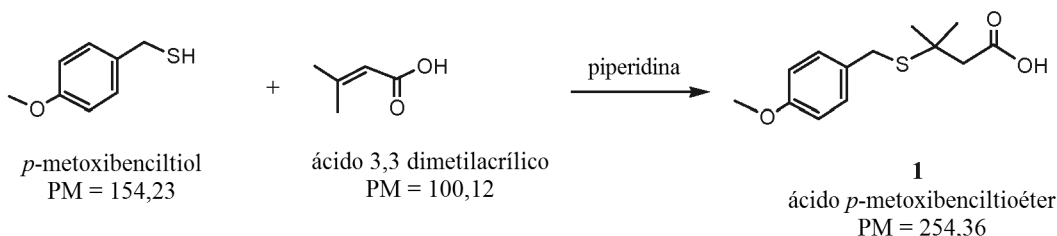
5 La presente invención se refiere a un procedimiento sintético mejorado de preparación de hidrazidas a partir de hidracina y cloruros de acilo. Los productos de hidrazida tienen un grupo tiol protegido que se usa para unir caliqueamicina a anticuerpos monoclonales.

Antecedentes de la invención

10 MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina), también denominado CMA-676 o simplemente CMA, consiste en un anticuerpo monoclonal anti CD33 que está unido a la caliqueamicina mediante un engarce hidrolizable con ácido. Cuando la caliqueamicina derivatizada se une al surco menor del ADN, interrumpe la progresión de ADN y con el tiempo provoca la muerte de células cancerosas. El producto comercial se comercializó como el primer agente quimioterapéutico dirigido al anticuerpo con el nombre de MYLOTARG® y está actualmente aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) en pacientes ancianos. El documento WO095/15769 describe la preparación y el uso de inmunoconjugados.

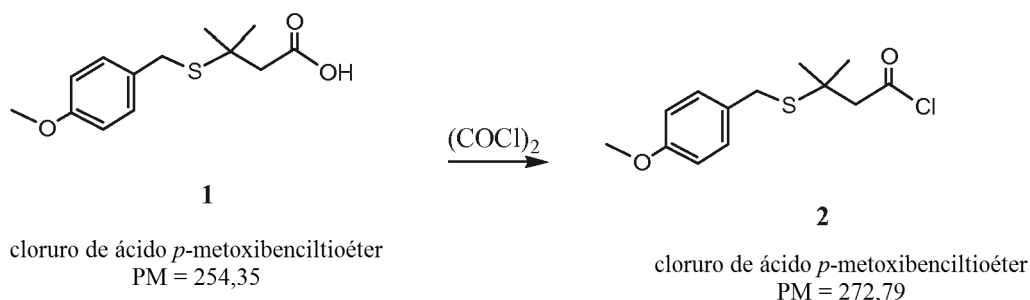
15 Los miembros de la potente familia de agentes antibacterianos y antitumorales, conocidos colectivamente como las caliqueamicinas o el complejo LL-E33288 se describen en las Patentes de EE.UU. N.º 4.970.198; 4.939.244 y 5.079.233. Los miembros de la familia pueden usarse para formar inmunoconjugados terapéuticamente útiles con anticuerpos monoclonales como portadores. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, hp67.6), un anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, G544), un anticuerpo anti-Lewis Y (por ejemplo, G193), un anticuerpo anti-5T4 (por ejemplo, H8) o un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, rituximab). El miembro de la familia de las caliqueamicinas es preferentemente N-acil caliqueamicina, ventajosamente, N-acetil gamma caliqueamicina. Los miembros de la familia de las caliqueamicinas contienen un metiltrisulfuro que puede hacerse reaccionar con tioles apropiados para formar disulfuros, al mismo tiempo que introducen un grupo funcional hidrazida que es útil para unir un derivado de caliqueamicina a un portador. Ejemplos de esta reacción con las caliqueamicinas se dan en la Patente de EE.UU. N.º 5.053.394. El derivado de hidrazida de la caliqueamicina está unido mediante la formación de hidrazona al anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, un procedimiento general de unión de derivados de hidrazidas de fármacos a anticuerpos oxidados se describe en TJ McKearn, y col., en la Patente de EE.UU. N.º 4.671.958. La Patente de EE.UU. N.º 5.770.701 se refiere a un procedimiento de preparación de formas selectivas de compuestos disulfuro del complejo LL-E33288. Un engarce, ácido 4-(4-acetil-fenoxi)butanoico, se condensa con el derivado de hidrazida de la caliqueamicina, preferentemente N-acetil gamma dimetil hidrazida de caliqueamicina, para proporcionar la hidrazona del ácido carboxílico que se trata adicionalmente con N-hidroxisuccinimida para dar el éster OSu (N-succinimidiloxi) que está listo para la conjugación con una biomacromolécula elegida. Las caliqueamicinas contienen una ojiva de enodilino que se activa por reducción del enlace -S-S- provocando roturas en el ADN bicatenario. Por tanto, las hidracinas monoaciladas en las que el grupo acilo contiene una función mercapto son útiles para unir caliqueamicinas a anticuerpos monoclonales. La hidrazida de ácido 3-metil-3-mercaptoputanoico, también llamada engarce de DMH o CL-332258, es una N-acilhidracina que contiene mercapto preferente con el fin de unir la caliqueamicina a anticuerpos monoclonales para fabricar, por ejemplo, gemtuzumab ozogamicina o inotuzumab ozogamicina. La caliqueamicina derivatizada se activa entonces para la conjugación con un anticuerpo monoclonal humanizado para dar CMA-676. Actualmente, el engarce de DMH puede prepararse mediante un procedimiento de reacción de 5 etapas a través del producto intermedio, *p*-metoxibenciltioéter hidrazida, **5**. (Ecuaciones I-V). En el presente procedimiento de fabricación llevado a cabo en los EE.UU., una adición de Michael de *p*-metoxi-benciltioil al ácido 3, 3 dimetilacrílico está asistida por piperidina, (Ecuación I).

Ecuación I



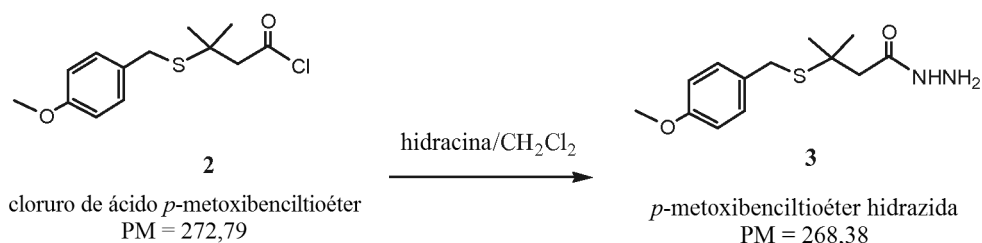
45 El ácido tioéter resultante (**1**) reacciona con cloruro de oxalilo en cloruro de metileno para formar cloruro (**2**) de ácido *p*-metoxibenciltioéter (Ecuación II).

Ecuación II



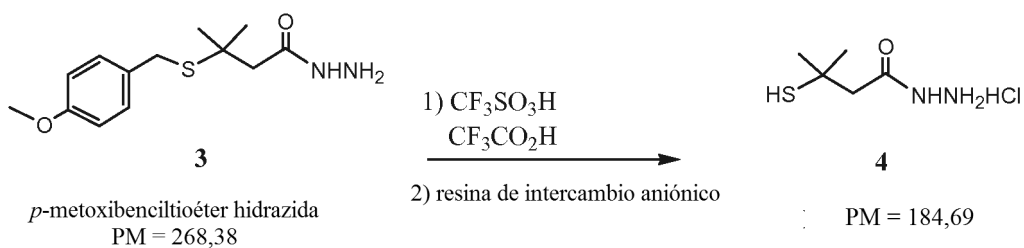
5 Se añade lentamente cloruro de ácido (2) a una mezcla de hidracina/cloruro de metileno (en una relación de aproximadamente 28 %, v/v) a baja temperatura (-70 °C). La correspondiente *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (3) se forma con un rendimiento de aproximadamente 74 % (Ecuación III):

Ecuación III



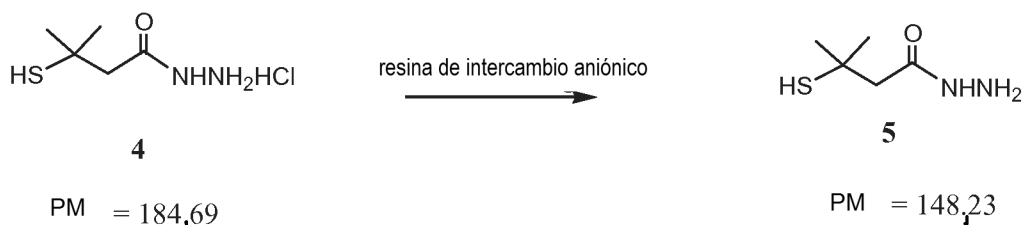
10 Sin embargo, el producto *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (3) típicamente contiene aproximadamente el 20 % de un subproducto no deseado, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (véase la Ecuación VI a continuación). La eliminación del grupo protector de bencilo en condiciones ácidas (Ecuación (IV), seguida de neutralización de la sal de ácido y la purificación (Ecuación V) proporciona hidrazida (5) de ácido 3-metil-3-mercaptobutanoico con un rendimiento del 45 %.

Ecuación IV



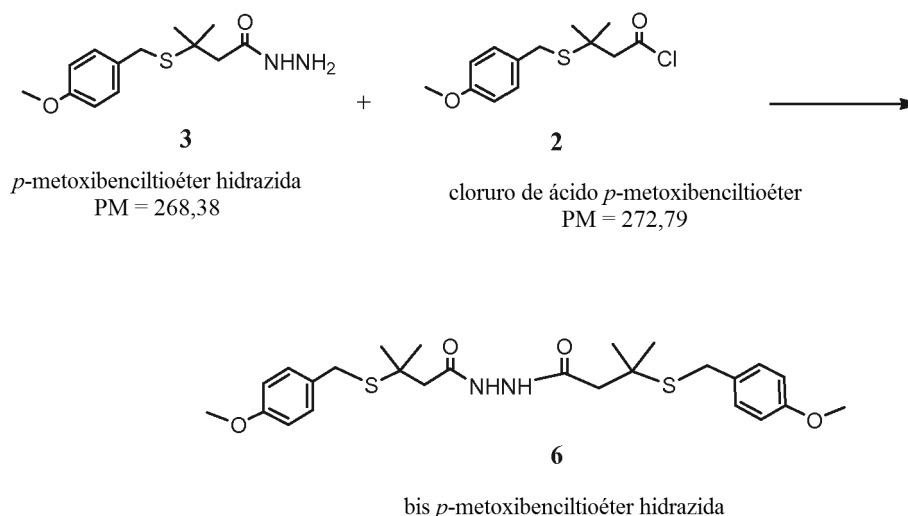
15

Ecuación V



20 Se genera un subproducto no deseado, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6) a partir de la reacción del producto *p*-metoxibenciltioéter hidrazida con el material de partida cloruro de ácido *p*-metoxibenciltioéter (Ecuación VI). La generación de este subproducto da como resultado un menor rendimiento y calidad.

Ecuación VI



5 Usando procedimientos de procedimientos originales, se genera la bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6) en cantidades de aproximadamente 20 %. La presencia de este nivel o mayor de subproducto indeseado a partir de la Ecuación III es claramente indeseable. La presente invención describe técnicas que superan este problema y disminuyen el rendimiento del subproducto no deseado.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 es un esquema del procedimiento de preparación del ácido *p*-metoxibenciltioéter (1).

10 La FIGURA 2 es un esquema del procedimiento de preparación del cloruro (2) de ácido *p*-metoxibenciltioéter y la hidrazida (3) de ácido metoxibenciltioéter.

La FIGURA 3 es un esquema del procedimiento de preparación del engarce (5) de DMH.

Sumario de la invención

15 Determinadas realizaciones de la presente invención proporcionan procedimientos de síntesis de hidrazidas (por ejemplo, hidrazida (4) del ácido 3-metil-3-mercaptobutanoico) mientras se reduce el nivel del subproducto bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6) (por ejemplo, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 3 a 5 %. En una realización de la invención, se añade una solución de cloruro (2) del ácido metoxibenciltioéster a una mezcla agitada de hidracina/cloruro de metileno que es más diluida que la del procedimiento original (por ejemplo, relación de volumen = 14 % frente a aproximadamente 24 % a 32 % v/v en el procedimiento original). Una relación de volumen preferente para la dilución es de aproximadamente 14% v/v. Opcionalmente y sin limitación, pueden usarse otros disolventes halogenados no reactivos (o inertes) en lugar de o en combinación con cloruro de metileno en las realizaciones de la invención descritas en el presente documento para formar la mezcla de hidracina a la que se añade el cloruro de ácido. Ejemplos preferentes de dichos otros disolventes incluyen tetracloruro de carbono, cloroformo, dicloruro de etileno y clorobenceno. En determinadas realizaciones, la cantidad de cloruro de metileno (o el correspondiente disolvente inerte) se duplica, reduciendo significativamente la cantidad de subproducto bis-hidrazida no deseado. En determinadas realizaciones, la solución del cloruro de ácido metoxibenciltioéster se añade a la suspensión de hidracina/cloruro de metileno continuamente, a una velocidad constante, en lugar de en porciones. La velocidad de adición se ajusta para mantener una temperatura de reacción de -68 a -75 °C. En determinadas realizaciones, se usa una velocidad de agitación de entre 300 y 400 rpm en un matraz de fondo redondo o 270 rpm en un matraz de tipo Morton. Determinados procedimientos de la invención han proporcionado *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (3) con una concentración de 91,1 % con un rendimiento de 85 % con aproximadamente el 4,7 % de la bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6) formada.

25 En otra realización de la invención, se encontró que a pesar de la mejora proporcionada usando el sistema de cloruro de metileno más diluido, todavía era necesario raspar la hidracina cristalizada congelada del fondo y los lados del vaso del reactor. La práctica convencional había sido previamente enfriar la solución de cloruro de metileno/hidracina conjuntamente a aproximadamente -70 °C. Esto dio como resultado una porción significativa de la hidracina que cristalizaba y precipitaba en los lados del vaso. Para asegurar que toda la hidracina estaba disponible para la reacción, era necesario raspar el material de las paredes del vaso para permitir que formara una suspensión agitable. Para evitar esta situación, se ideó un procedimiento alternativo como parte de la presente invención. Este procedimiento alternativo implica el enfriamiento del cloruro de metileno a -68 a -75 °C, preferentemente -70 °C, seguido de una adición gota a gota lenta de hidracina al cloruro de metileno frío para formar una suspensión uniforme. Este nuevo procedimiento consigue la formación de una suspensión de hidracina mucho más uniforme,

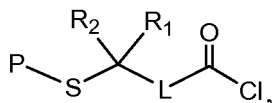
que minimiza la formación de hidracina cristalizada en las paredes internas del matraz y reduce o elimina la necesidad de raspar el matraz. Esto permite que la cantidad deseada de hidracina esté disponible para la reacción, lo que ayuda a reducir la formación de la bis-metoxibenciltioéter hidrazida (**6**).

5 El procedimiento implica la adición continua de una solución de cloruro (**2**) de ácido metoxibenciltioéter a una mezcla heterogénea agitable de hidracina/cloruro de metileno (preferentemente que tenga una concentración de hidracina de aproximadamente 14 %) comparativamente diluida (desde la perspectiva del procedimiento anterior) y enfriada. La solución del cloruro de ácido metoxibenciltioéter se añade a la suspensión de hidracina/cloruro de metileno continuamente, a una velocidad aproximadamente constante en lugar de en porciones. La velocidad de adición se ajusta para mantener una temperatura de reacción de -68 a -75 °C. Se prefiere una velocidad de agitación de entre 10 300-400 rpm en un matraz de fondo redondo o 270 rpm en un matraz de tipo Morton. Los procedimientos mejorados de determinadas realizaciones de la invención reducen el nivel del subproducto, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (**6**), desde el nivel previamente conseguido de aproximadamente 20 % a aproximadamente 3 a 5 % o inferior. La síntesis mejorada del producto intermedio **1** mejora la eficacia del procedimiento global de síntesis de la gemituzumab ozogamicina.

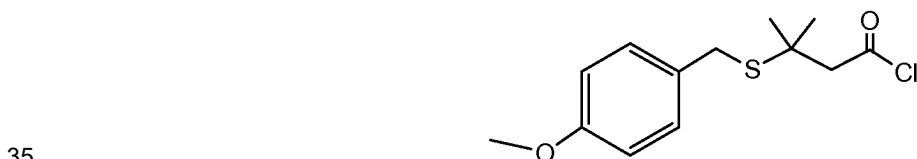
15 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan un procedimiento de preparación de una hidrazida a partir de hidracina y un cloruro de acilo como se reivindica en la reivindicación 1. En otro aspecto de la presente realización, el cloruro de acilo se añade sustancialmente gota a gota a la suspensión en la etapa de adición (b).

La preparación se lleva a cabo mediante una reacción química entre un acil carbonilo electrófilo del cloruro de acilo y un nitrógeno nucleófilo de hidracina. Los sustituyentes particulares unidos al acilcarbonilo que son adecuados para la 20 invención son un resto que no interfiere con la formación del enlace hidrazida y que incorpora un grupo protector con el fin de evitar la interferencia con la formación del enlace hidrazida. El uso y la eliminación de grupos protectores se describe en McOmie, Protecting Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, NY, 1973, y Greene y Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, 4ª Ed., John Wiley & Sons, NY, 2006. Un ejemplo de un tiol protegido es un benciltioéter.

25 En un aspecto de la invención, los cloruros de acilo tienen una estructura:

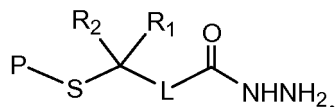


en la que P es un grupo protector de tiol, que es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido en el anillo de fenilo, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno del grupo que consiste en alquilo C₁-C₅ y L es un engarce de alquileno. Ejemplos de engarces de alquileno L incluyen, pero sin limitación, L como -(CH₂)_n-, en el que n es un número entero de 1 a 5. En 30 determinadas realizaciones, R₁ y R₂ son iguales, tal como cuando R₁ y R₂ son ambos el mismo alquilo C₁-C₅. Ejemplos de alquilo C₁-C₅ incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, incluyendo sus isómeros tanto lineales como ramificados. Ejemplos de sustituyentes opcionales incluyen, pero no sin limitación un alcoxi, tal como metoxi, etoxi y similares. Por consiguiente, en una realización de la invención, un cloruro de acilo tiene la estructura:



Otra realización de la presente invención es un procedimiento de preparación de una hidrazida a partir de hidracina y un cloruro de acilo que comprende una primera etapa de preparación de una suspensión agitada sustancialmente uniforme que comprende hidracina y un disolvente inerte. En otro aspecto de la presente realización, un disolvente inerte es cloruro de metileno.

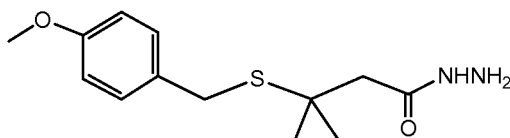
40 Otra realización de la presente invención es un procedimiento de preparación de una hidrazida a partir de hidracina y un cloruro de acilo. En otro aspecto de la presente realización, un producto de hidrazida tiene la estructura:



en la que P, L y R₁ y R₂, son como se indicó anteriormente. En otro aspecto de la presente realización, P es un grupo *p*-metoxibencilo y R₁ y R₂ se seleccionan cada uno del grupo que consiste en alquilo C₁-C₅ y L es un engarce de alquileno. Ejemplos de engarces de alquileno incluyen, pero sin limitación, L como -CH₂-. En una realización, R₁ y R₂ son cada uno independientemente metilo.

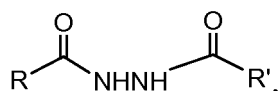
45

Otra realización de la presente invención son productos de hidrazida preparados de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. En una realización, una hidrazida deseada tiene una estructura:



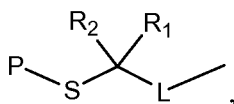
En otra realización más de la invención, la hidrazida es hidrazida de ácido 3-metil-3-mercaptobutanoico.

- 5 En otro aspecto de la invención, el producto de hidrazida deseado contiene menos del 5 % de un subproducto bis-hidrazida. teniendo la estructura:



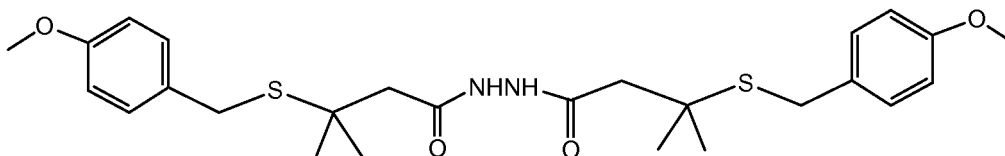
en la que,

los restos R y R' en un subproducto bis-hidrazida son cada uno



- 10 en la que P es un grupo protector de tiol, que es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido en el anillo de fenilo, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno del grupo que consiste en alquilo C₁-C₅ y L es un engarce de alquileno. Ejemplos de engarces de alquileno, L, incluyen pero sin limitación, -CH₂-. En otro aspecto de la presente realización, R₁ y R₂ son cada uno independientemente metilo. En la presente realización, P es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido en el anillo de fenilo; ejemplos incluyen pero sin limitación, P como *p*-metoxibencilo.
- 15

Otra realización de la invención es un procedimiento de preparación de una hidrazida a partir de hidracina y un cloruro de acilo en el que el producto de hidrazida contiene menos del 5 % de un subproducto bis-hidrazida que tiene una estructura:



- 20 La presente invención es un procedimiento de preparación de una hidrazida a partir de hidracina y un cloruro de acilo que comprende una primera etapa de preparación de una suspensión agitada sustancialmente uniforme que comprende hidracina y un disolvente inerte y una segunda etapa de añadir después un cloruro de acilo continuamente a la suspensión en el que se ajusta la adición continua de la solución del cloruro de ácido para mantener la temperatura de reacción de aproximadamente -68 °C a aproximadamente -75 °C. La suspensión de hidracina es sustancialmente uniforme.
- 25

En una realización de la invención, se prepara un engarce de hidrazida de acuerdo con un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1. En un aspecto de la presente realización, el disolvente inerte es cloruro de metileno.

En aún otro aspecto de la presente realización, la suspensión de hidracina se agita a una velocidad de aproximadamente 270 a aproximadamente 400 rpm.

- 30 Otra realización de la invención es un procedimiento de preparación de un inmunoconjugado de un miembro de la familia de las caliqueamicinas con un anticuerpo monoclonal como portador, que comprende preparar una hidracina monoacilada en el que el grupo acilo contiene una función mercapto protegida en S de acuerdo con un procedimiento de la invención, eliminar el grupo protector y usar la hidrazida resultante para preparar dicho inmunoconjugado. Otra realización de la invención es un procedimiento de preparación de gemtuzumab ozogamicina o inotuzumab ozogamicina, que comprende las etapas de preparar la hidrazida del ácido 3-metil-3-mercaptobutanoico de engarce de acuerdo con un procedimiento de la invención y usar dicho engarce para fabricar gemtuzumab ozogamicina o inotuzumab ozogamicina.
- 35

Descripción detallada de la invención

El *p*-metoxibenciltiol se somete a una adición de Michael con ácido 3, 3-dimetilacrílico en piperidina. Las cantidades de reactivos afectan el resultado de la reacción. En una realización, la cantidad de *p*-metoxibencil tiol está en un ligero exceso molar sobre el ácido 3, 3-dimetilacrílico, tal como el intervalo de entre 0,354 (2,3 mol) y 0,362 kg (2,35 mol). Si la cantidad está por debajo de este intervalo, la reacción posterior puede ser incompleta. Si la cantidad está por encima de este intervalo, el exceso de reactivo puede complicar el procesamiento. La mezcla de reacción se calienta, teniendo cuidado de no exceder aproximadamente 98 °C durante un mínimo de aproximadamente 15 horas con el fin de evitar la formación excesiva de impurezas. La piperidina se elimina por dilución con cloruro de metileno y se lava con ácido clorhídrico acuoso y luego con agua. Es necesario mantener la temperatura por encima de 50 °C e inferior a 90 °C antes y durante la adición de HCl para evitar la precipitación del producto de reacción. La reacción se enfría adicionalmente y luego se extrae con cloruro de metileno como se indica en la sección experimental.

Las cantidades de disolventes usadas son proporcionales a la escala de la reacción para obtener resultados óptimos y purificación. La solución del producto de CH₂Cl₂ resultante se seca con sulfato de magnesio, se clarifica, se concentra a vacío, luego se diluye con heptano para precipitar el producto intermedio bruto, que se filtra y se lava con heptano. La purificación se lleva a cabo volviendo a disolver el material bruto en cloruro de metileno y precipitando de nuevo con heptano. El ácido *p*-metoxibenciltioéter (1) purificado se aísla por filtración, se lava con heptano y se seca bajo vacío.

El ácido *p*-metoxibenciltioéter (1) se convierte en el cloruro de ácido correspondiente usando cloruro de oxalilo con cloruro de metileno como disolvente. El cloruro de oxalilo debe estar presente en exceso molar con respecto al ácido *p*-metoxibenciltioéter para una reacción completa. El producto de cloruro de ácido se aísla por concentración bajo vacío para eliminar cloruro de metileno/cloruro de oxalilo en exceso hasta un aceite. El aceite resultante se diluye con cloruro de metileno y se añade lentamente en el transcurso del tiempo durante aproximadamente 3 a 5 horas a un intervalo de temperatura de 65 a 75 °C a una mezcla diluida de hidracina y cloruro de metileno.

Un aspecto de la presente invención es la formación de una suspensión uniforme que comprende hidracina y un disolvente inerte tal como cloruro de metileno. De acuerdo con una realización de la invención, se prepara una suspensión uniforme mediante la adición lenta gota a gota de hidracina líquida a cloruro de metileno que se había enfriado previamente a aproximadamente -68 a -75 °C, preferentemente -70 °C, antes de comenzar la adición de hidracina. Por el contrario, enfriar una solución premezclada de hidracina en cloruro de metileno a la misma temperatura da como resultado la formación menos favorable de una hidracina cristalina que se recoge en los lados del vaso de reacción. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que la adición lenta, gota a gota de hidracina al cloruro de metileno previamente enfriado y el control de la concentración máxima de hidracina en el cloruro de metileno da como resultado la formación de cristales más pequeños y más uniformes de hidracina que permanecen suspendidos en la mezcla agitada del cloruro de metileno y sustancialmente no se congelan en las paredes del vaso. La formación de una suspensión sustancialmente uniforme ayuda a asegurar que la hidracina permanece en contacto con el cloruro de metileno agitado y está disponible para la reacción con la solución entrante de cloruro de ácido. La formación de una suspensión uniforme evita la necesidad de raspar el interior del matraz de reacción como se requiere en el procedimiento anterior. Además, esto asegura que la cantidad deseada de hidracina está disponible para la reacción, lo que también reduce la cantidad de bis-metoxibenciltioéter hidracina (6) formada.

La concentración de hidracina en cloruro de metileno afecta a la cantidad de bis-metoxibenciltioéter hidracina (6) que se forma como subproducto. En procedimientos anteriores, la concentración de hidracina/cloruro de metileno era de aproximadamente 24 a 32 % v/v. Reducir a la mitad la relación de hidracina/cloruro de metileno (más hidracina diluida) a aproximadamente 12 a 16 % v/v, preferentemente a aproximadamente 14 % v/v, dio como resultado una disminución de la cantidad de bis-metoxibenciltioéter hidracina (6) no deseada formada (véase Tabla 1).

TABLA 1 RESULTADOS DEL PROCEDIMIENTO DESPUÉS DE LA MEJORA

Exp. n.º	Concentración de la hidracina* (%)	Subproducto bis-hidracina (%)	Rendimiento de la hidracina corregida (%)
1.1	91,61	9,69	85,4
1.2	95,08	5,76	87,7
1.3	96,16	4,13	89,6
1.4	93,76	7,36	85,7
*determinada por cromatografía líquida de alta presión			

En determinadas realizaciones de la invención, la solución de cloruro de ácido se añade a la suspensión de hidracina/cloruro de metileno continuamente, a una velocidad constante en lugar de en porciones. La cantidad de cloruro de ácido añadido y la velocidad de su adición afectan ambos al rendimiento del metoxibenciltioéter (3)

deseado. Si se añade demasiado poco cloruro de ácido, pueden formarse cantidades excesivas de subproducto bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6). Además, si el tiempo de adición del cloruro de ácido es demasiado corto, inferior a 3 horas, pueden formarse cantidades excesivas de subproducto bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6). La velocidad de adición se ajusta para mantener una temperatura de reacción de -68 a -75 °C. Si la temperatura de reacción aumenta a temperaturas más altas, pueden formarse cantidades excesivas de la bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6). Se usa preferentemente una velocidad de agitación de entre 300 a 400 rpm en un matraz de fondo redondo o 270 rpm en un matraz de tipo Morton para agitar la pasta de hidracina. Ambos aspectos del procedimiento mejorado, el uso de una mezcla más diluida de hidracina/cloruro de metileno y la formación de una suspensión uniforme, reducen el nivel del subproducto, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6), de aproximadamente 20 % a aproximadamente 3 a 5 %. Las etapas del procedimiento mejorado para formar la hidracina mejora la eficacia global de la síntesis de la hidrazida del ácido 3-metil-3-mercaptopbutanoico de engarce y por lo tanto también mejora la eficacia global de la preparación de MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina).

Tras completar la reacción, la mezcla de reacción se concentra bajo vacío y el residuo se trata con hidróxido de sodio metanólico (aproximadamente 4 a 5 %). Esta solución se concentra bajo vacío, se diluye con cloruro de metileno, se lava con agua, se seca sobre sulfato de magnesio, se clarifica y se concentra bajo vacío hasta un concentrado. Se debe tener cuidado de usar suficiente sulfato de magnesio para secar completamente el producto para que no haya descomposición o interferencia con la cristalización del producto en la siguiente etapa de síntesis. El concentrado final se diluye con cloruro de metileno en una cantidad de 1,33 veces el peso del ácido *p*-metoxibenciltioéter (1), y esta solución se añade a éter dietílico en una cantidad de 7,6 veces el peso del ácido *p*-metoxibenciltioéter (1). Se añade a la suspensión resultante un disolvente de hidrocarburo alifático tal como heptano, hexano, octano o isohexano, preferentemente heptano, en una cantidad de 1,83 veces el peso del ácido *p*-metoxibenciltioéter (1) para completar la precipitación. La *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (6) se aísla por filtración, se lava con heptano y se seca bajo vacío.

La *p*-metoxibenciltioerhidrazida (3) se trata con ácido trifluorometanosulfónico en presencia de anisol, usando ácido trifluoroacético como disolvente. Debe tenerse cuidado durante la adición y el tiempo de reacción posterior para no exceder una temperatura de reacción de aproximadamente 20 °C con el fin de evitar la formación de impurezas no deseadas. Después de que se completa la escisión del grupo protector *p*-metoxibencilo, la mezcla de reacción se enfría bruscamente en metanol y se filtra para eliminar los subproductos sólidos. Los filtrados se concentran bajo vacío, se disuelven en agua, se lavan con cloruro de metileno y se tratan con una resina de intercambio aniónico para dar hidrazida (5) de ácido 3-metil-3-mercaptopbutanoico. La resina se elimina por filtración y a continuación se añade ácido clorhídrico acuoso a la solución de producto bruto para formar la sal de HCl. El lote se concentra bajo vacío, se disuelve en etanol, se clarifica por filtración y se concentra bajo vacío. Este concentrado se diluye con acetato de etilo y se concentra bajo vacío. De nuevo, el residuo se diluye con acetato de etilo y luego se aísla por filtración. La torta húmeda se calienta con acetato de etilo a aproximadamente 48 a 55 °C, se enfría, se filtra y se seca por succión. La sal de HCl seca se convierte en la base libre por tratamiento con una resina de intercambio aniónico en agua. La resina se elimina por filtración y los filtrados se concentran bajo vacío. El concentrado se disuelve en etanol, se concentra bajo vacío, se suspende en éter etílico y se concentra bajo vacío. Como purificación final, la hidrazida (5) de ácido 3-metil-3-mercaptopbutanoico se disuelve en cloruro de metileno, se clarifica por filtración y se trata con sílice, que se elimina después por filtración. El producto purificado en solución se aísla por concentración bajo vacío. En un procedimiento de purificación preferente, demostrado en el Ejemplo 15, la hidrazida (5) de ácido 3-metil-3-mercaptopbutanoico se disuelve en 50 partes (v/p) de cloruro de metileno a 20 °C ± 3 °C, se agita 30 minutos y se filtra. La solución resultante se trata con gel de sílice de 0,7-1 partes (p/p frente al engarce bruto), se agita 30 minutos, se filtra y se concentra hasta sequedad en un evaporador rotatorio. El sólido resultante se tritura con *n*-heptano. Después de aislar y secar bajo vacío, se obtiene la hidrazida (5) de ácido 3-metil-3-mercaptopbutanoico como un sólido que fluye libremente con un rendimiento de aproximadamente 76 %.

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento que proporciona *p*-metoxibenciltioéter hidrazida con menos del 5 % del subproducto no deseado, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6). Este procedimiento mejorado comprende un procedimiento modificado del acoplamiento de cloruro de ácido tioéter con hidracina para formar *p*-metoxibenciltioéter hidrazida. Las etapas del procedimiento se muestran esquemáticamente en la Ecuación I. El subproducto no deseado, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6), se genera a partir del acoplamiento del producto, *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (3), con el material de partida, cloruro (2) de ácido *p*-metoxibenciltioéter. La generación de bis-metoxibenciltioéter hidrazida (6) no deseada da como resultado una menor calidad y rendimiento.

En otro aspecto de la presente invención, la divulgación del procedimiento puede entenderse conceptualmente que abarca aplicaciones más amplias. La secuencia de la reacción específica (Ecuación III) puede generalizarse en términos de la Ecuación VII:

Las dos capas se dejaron separar durante un mínimo de 10 minutos. La capa orgánica (inferior) se transfirió desde el embudo de decantación hasta el matraz de reacción de 5 l. La capa acuosa (superior) se transfirió desde el embudo de decantación hasta un matraz Erlenmeyer (4 l). Se cargó una solución de ácido clorhídrico 3M (1.050 ml, 1.154 g) a través de un embudo de adición de igualación de presión de 1.000 ml a la solución de cloruro de metileno en el vaso de 5 l durante 10 minutos. Se verificó el pH de la capa acuosa superior del matraz y se añadió HCl 3M según se necesitó hasta que el pH de la capa acuosa fuera inferior a 2. Todo el contenido del matraz de reacción de 5 l se transfirió a un embudo de decantación de 4 l. El volumen combinado se registró. Las dos capas se dejaron separar durante un mínimo de 10 minutos. La capa orgánica (inferior) se transfirió desde el embudo de decantación hasta un matraz Erlenmeyer de 4 l limpio. La capa acuosa (superior) se transfirió desde el embudo de decantación hasta un matraz Erlenmeyer de 4 l limpio. Las capas acuosas se combinaron en un matraz de reacción de 5 l.

Se cargó cloruro de metileno (305 ml, 400 g) en la solución acuosa obtenida en la etapa anterior. La mezcla se agitó durante un mínimo de 5 minutos. Todo el contenido del matraz de 5 l se transfirió a un embudo de decantación de 6 l y se registró el volumen combinado. Las dos capas se dejaron asentar durante al menos 5 minutos. La capa orgánica (inferior) se transfirió desde el embudo de decantación hasta el matraz Erlenmeyer de 4 l. La solución de cloruro de metileno se lavó con 1.000 ml de agua. La mezcla se agitó a fondo durante 1 a 2 minutos y luego se dejó asentar durante un mínimo de 10 minutos. La capa acuosa se separó. Se midió el pH de la capa acuosa en el matraz. Las capas acuosas se combinaron y se desecharon. Se añadió sulfato de magnesio anhidro (110 g) a la solución de cloruro de metileno y se agitó durante al menos 15 minutos. Un matraz de reacción (5 l) se marcó previamente a niveles de 800, 900 y 1.000 ml. Usando succión, la mezcla de color amarillo se filtró a través de un embudo Buchner de 15 cm con papel de filtro (Whatman #1) en un matraz de reacción de 5 l. El matraz y la torta de filtración se enjuagaron con 300 ml, 400 g de cloruro de metileno. La solución de cloruro de metileno se concentró de la siguiente manera: El matraz de fondo redondo de 5 l se equipó con un agitador mecánico y una cabeza fija de Claisen equipada con un termopar. La cabeza fija estaba conectada a un condensador sencillo de 30 cm y el condensador estaba unido a un adaptador receptor que estaba equipado con un matraz de 1 l enfriado en un baño de hielo. El adaptador receptor estaba conectado a una trampa helada. La trampa de frío estaba conectada a una bomba de vacío.

El cloruro de metileno de la solución del matraz de 5 l se destiló a una temperatura de 15 a 35 °C, bajo vacío, hasta que se alcanzó un volumen de recipiente de aproximadamente 900 ml. El destilado se desechó. La temperatura del contenido del matraz de reacción de 5 l se ajustó a desde 15 a 20 °C. Se cargó heptano (2.442 ml, 1.670 g) a través de un embudo de adición de igualación de presión a la solución concentrada agitada durante un mínimo de aproximadamente 10 minutos. Se formó un precipitado después de la adición de aproximadamente 1.000 ml, 684 g de heptano. La mezcla heterogénea se enfrió con agitación a una temperatura de entre 0 a 5 °C durante un mínimo de 20 minutos y se mantuvo a esa temperatura durante un mínimo de 30 minutos. El contenido del matraz de reacción de 5 l se filtró a través de un embudo Buchner de 30 cm con papel de filtro Whatman #1. El filtrado se recogió en un matraz de succión de 4 l. El matraz de reacción de 5 l se enjuagó de la torta de filtración con 2 x 310 ml, 2 x 212 g de heptano. La torta de filtración se secó con succión hasta que esencialmente no se recogió más filtrado y durante un mínimo de 25 minutos. La altura de la torta de filtración era de aproximadamente 20 mm. El peso de la torta de filtración era de aproximadamente 601 g. El filtrado se desechó. La torta se transfirió a un matraz de fondo redondo de 5 l equipado con un termopar, un agitador mecánico, una entrada de N₂ y un embudo de adición de igualación de presión de 1 l. Se cargó cloruro de metileno (750 ml, 990 g) en el matraz de reacción de 5 l y se agitó hasta que todos los sólidos se disolvieron (aproximadamente 10 minutos). Se cargó heptano (1.060 ml, 725 g) en el matraz de reacción de 5 l. La solución heterogénea se enfrió a 0 a 5 °C usando un baño de hielo durante un mínimo de 15 minutos y luego se agitó durante al menos 30 minutos. Se observó una solución heterogénea espesa. El contenido del matraz de reacción de 5 l se filtró en un embudo Buchner de 30 cm con papel de filtro Whatman #1. El filtrado se recogió en un matraz de succión de 4 l. El matraz de reacción de 5 l se enjuagó de la torta de filtración con 2 x 310 ml, 2 x 212 g de heptano. La torta de filtración se secó con succión hasta que esencialmente no se recogió más filtrado (un mínimo de 20 minutos). La altura de la torta de filtración era de aproximadamente 20 mm. El peso de la torta de filtración era de aproximadamente 632 g. El filtrado se desechó. La torta húmeda se transfirió a un plato de secado. El plato de secado que contenía el ácido *p*-metoxibenciltioéter se cubrió con papel de filtro limpio. El producto se secó en un horno de vacío a 38 a 40 °C y vacío de 28 a 30 pulgadas de Hg durante aproximadamente 20 horas.

Ejemplo 2

Preparación original del cloruro de ácido p-metoxibenciltioéter (2)

Con referencia a la Ecuación II, se cargó ácido *p*-metoxibenciltioéter (400 g, 1,57 moles) en un matraz de fondo redondo de 5 l equipado con un termopar, un agitador mecánico, un condensador de reflujo cubierto con una entrada de N₂ y un embudo de adición de igualación de presión de 0,5 l. Se cargó cloruro de metileno (1.600 g, 1.212 ml) en el matraz de reacción de 5 l. La solución transparente se calentó a 20 a 25 °C. El cloruro de metileno (300 g) y cloruro de oxalilo (110 g, 78 ml) se cargaron en el embudo de adición de igualación de presión de 0,5 l. Se añadieron 350 ml de solución de cloruro de oxalilo/cloruro de metileno a través del embudo de adición mientras se mantenía la temperatura de reacción a 20 a 30 °C. La solución de color amarillo claro se agitó a 20 a 25 °C durante un mínimo de 30 minutos hasta que el burbujeo disminuyó. La adición de cloruro de oxalilo se repitió. Se añadieron 350 ml de solución de cloruro de oxalilo/cloruro de metileno a través del embudo de adición de igualación de presión al matraz

de reacción mientras se mantenía la temperatura de reacción a 20 a 30 °C (tiempo de adición de aproximadamente 45 minutos). La mezcla de reacción se calentó a aproximadamente 32 a 38 °C. La solución agitada se mantuvo en este intervalo de temperatura durante un mínimo de 1 hora. Se retiró una muestra de 1 ml para el análisis HPLC. La reacción se consideró completa cuando quedó menos del 3 % por área del material de partida de ácido metoxibenciltioéter. La reacción se enfrió a entre 23 a 28 °C durante un mínimo de 5 minutos. La solución se transfirió a un matraz de fondo redondo de 3 l tarado. El matraz de reacción se enjuagó en el matraz de 3 l con 100 ml, 132 g de cloruro de metileno. La solución de reacción era una solución concentrada bajo vacío, con un evaporador rotatorio con una temperatura de baño fijada en 33 a 36 °C y una presión de 25 a 28 pulgadas de Hg, hasta que no quedaran volátiles. El peso final fue de 1.367 g y el peso neto fue de 500,3 g de cloruro de ácido *p*-metoxibenciltioéter. El destilado se desechó.

Ejemplo 3

Preparación original de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)

Con referencia a la Ecuación III, se equipó un matraz de fondo redondo tipo Morton de 5 l con un termopar, un agitador mecánico, un condensador de reflujo cubierto con una entrada de N₂ y un embudo de adición de igualación de presión de 0,5 l. Se disolvió cloruro de ácido *p*-metoxilbenciltioéter en 500 ml, 660 g de cloruro de metileno. La solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 l. Se añadieron 500 ml de cloruro de metileno para constituir un volumen total de 1.300 ml de solución.

En un matraz de fondo redondo (MFR) de 5 l, tipo Morton, se cargaron 2.400 g, 1.818 ml de cloruro de metileno y 256 g, 245 ml en una concentración del 98 % y 7,8 mol de hidrazina anhidra. La velocidad del agitador mecánico se fijó en 255-270 rpm. La suspensión turbia se enfrió a -69 a -72 °C usando hielo seco/acetona.

La solución del cloruro de ácido se añadió gota a gota al matraz de reacción de 5 l a través del embudo de adición de igualación de presión de 0,5 l, manteniendo una temperatura de reacción de -68 a -72 °C. Era importante ajustar la velocidad de adición de la solución de cloruro de ácido metilbenciltioéter a la suspensión agitada de hidracina/cloruro de metileno a una velocidad que asegurara una temperatura de reacción de menos de -67 °C. La adición se completó después de aproximadamente 3 horas. La reacción agitada se mantuvo a -68 a -72 °C durante un mínimo de 30 min. Se retiró una muestra de 1 ml para el análisis de HPLC. La solución se calentó hasta temperatura ambiente (20 a 30 °C) eliminando el baño de hielo.

La mezcla de reacción se transfirió a un matraz de fondo redondo de 3 l tarado. La solución de reacción se concentró bajo vacío mediante un evaporador rotatorio. La temperatura del baño se fijó en 32 a 36 °C y la presión de 25 a 28 pulgadas de Hg. Todos los volátiles se retiraron. El peso final fue de 1.490,7 g y el peso neto fue de 630 g de *p*-metoxibenciltioéter hidrazida sólida bruta. El destilado se desechó.

Se añadió metanol (1.250 g, 1.580 ml) a la *p*-metoxilbenciltioéter hidrazida sólida bruta y la mezcla heterogénea se mezcló en un matraz de fondo redondo de 5 l a 33 a 36 °C durante un mínimo de 5 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. La solución de *p*-metoxilbenciltioéter hidrazida/metanol bruta se transfirió a un matraz de reacción de 5 l.

Se cargaron 1.312 g de solución de hidróxido de sodio/metanol al 4 % en el matraz de reacción de 5 l a 28 a 34 °C durante 8 minutos. La mezcla transparente se agitó a 33 a 36 °C durante 20 minutos. Se formó un precipitado ligero.

El contenido del matraz de reacción de 5 l se filtró en un embudo Buchner de 30 cm con papel de filtro (Whatman #1). El matraz de reacción (5 l) se enjuagó con 200 ml, 158 g de metanol. El filtrado se transfirió a un matraz de fondo redondo de 3 l tarado. La solución de reacción se concentró bajo vacío, con un evaporador rotatorio. La temperatura del baño se fijó en 36 a 40 °C y la presión de 25 a 28 pulgadas de Hg. Todos los volátiles se retiraron. El peso final fue de 1.484 g y el peso neto fue de 622,7 g de *p*-metoxilbenciltioéter hidrazida bruta sólida. El destilado se desechó. El sólido se disolvió en 700 g, 530 ml de cloruro de metileno. La mezcla heterogénea se mezcló en el evaporador rotatorio (sin vacío), a 33 a 36 °C durante un mínimo de 10 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente.

La solución se concentró bajo vacío con el evaporador rotatorio. La temperatura del baño se fijó en 36 a 40 °C con una presión de 28 a 30 pulgadas de Hg. Todos los volátiles se retiraron. El peso final fue de 1.494,2 g y el peso neto fue de 632,5 g de *p*-metoxilbenciltioéter hidrazida bruta sólida. El destilado se desechó. El sólido se disolvió con 2.100 ml, 2.772 g de cloruro de metilo. La mezcla heterogénea se mezcló a 20 a 25 °C durante un mínimo de 5 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. Se añadió 110 g de sulfato de magnesio anhidro a la solución de cloruro de metileno, y la mezcla se agitó durante 1 hora. Usando succión, la mezcla de color amarillo se filtró a través de un embudo Buchner de 15 cm con papel de filtro (Whatman #1) en un matraz de reacción de 5 l. El matraz y la torta de filtración se enjuagaron con 500 ml, 660 g de cloruro de metileno. El filtrado se transfirió a un matraz de fondo redondo de 3 l tarado. La solución se *concentró bajo vacío*, con un evaporador rotatorio. La temperatura del baño se fijó en 32 a 35 °C con una presión de 20 a 25 pulgadas de Hg. Todos los volátiles se retiraron. El peso final fue de 1.090 g y el peso neto fue de 643 g de *p*-metoxilbenciltioéter hidrazida bruta sólida. El destilado se desechó.

El sólido se disolvió con 400 ml, 528 g de cloruro de metilo. La mezcla heterogénea se mezcló a 35 a 40 °C durante un mínimo de 5 minutos hasta que se obtuvo una solución amarilla transparente. Se cargó 4.260 ml, 3.040 g de éter a un matraz de fondo redondo de 12 l equipado con un termopar, un agitador mecánico, una entrada de N₂ y un embudo de adición de igualación de presión de 2 l. El éter se enfrió en el matraz de 12 l a 0 a -10 °C usando salmuera y hielo. La solución amarilla de *p*-metoxibenciltioéter hidrazida/cloruro de metileno (preparada anteriormente) se añadió a través de un embudo de adición de igualación de presión al éter rápidamente agitado de 300-400 rpm mientras se mantenía la temperatura a 0 a -10 °C. Se cargaron 1.070 ml, 732 g de heptano. La mezcla heterogénea se agitó a 0 a -5 °C durante 20 minutos. El contenido del matraz de reacción (12 l) se filtró a través de un embudo Buchner de 30 cm con papel de filtro (Whatman #1). El filtrado se recogió en un matraz de succión de 4 l. El matraz de reacción de 5 l se enjuagó de la torta con 1.070 ml, 732 g de heptano. El filtrado se desechó. La torta de filtración se secó con succión durante un mínimo de 50 minutos hasta que esencialmente no se recogió más filtrado. La altura torta de filtración fue de 15 mm. El peso de la torta de filtración fue de 429 g. La torta húmeda se transfirió un plato de secado. El plato de secado que contenía el ácido *p*-metoxibenciltioéter se cubrió con papel de filtro limpio. El producto se secó en un horno de vacío a 38 a 40 °C y vacío de 28 a 30 pulgadas de Hg durante al menos 18 horas.

Los resultados de las reacciones de lotes típicos usando los procedimientos de los Ejemplos 1-3 se recogen en la Tabla 2.

TABLA 2 LOTES TÍPICOS ANTES DE AÑADIR MEJORAS EN LOS PROCEDIMIENTOS

Lote n.º	Concentración de la hidrazida (%)	Subproducto bis-hidrazida (%)	Rendimiento de la hidrazida corregida (%)
2.1	78,5	22,1	67,8
2.2	78,4	19,3	74,8

Ejemplo 4

Preparación modificada de *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (3)

Con el fin de reducir el nivel del subproducto, bis-metoxibenciltioéter hidrazida (**6**), se investigaron los parámetros de reacción que influyen en la formación de este subproducto en el producto aislado, *p*-metoxibenciltioéter hidrazida. Se repitió el procedimiento del Ejemplo 3. A -78 °C la solución de hidracina/CH₂Cl₂ es una mezcla congelada que no puede agitarse. Los conglomerados gomosos se pegaban al matraz de reacción mientras que la cuchilla de agitación se hacía girar en el aire. Se añadió una solución de cloruro de ácido tioéter/CH₂Cl₂ gota a gota a esta mezcla congelada de hidracina/CH₂Cl₂ (28 % v/v), mientras se mantenía la temperatura a aproximadamente -72 °C. El análisis HPLC al final de la adición (la temperatura era de -72 °C) mostró poca reacción. Esto era contrario a la expectativa de lo que es una reacción rápida. Esto podría deberse a una falta de mezclado apropiado en la reacción. Se dejó calentar la mezcla de reacción en gran parte sin reaccionar. Cuando la temperatura alcanzó aproximadamente -50 °C, se desarrolló una mezcla heterogénea agitable, seguido de una reacción exotérmica rápida que impulsó la temperatura instantáneamente a -28 °C en la que el color de la reacción cambió de amarillo a blanquecino. Esto condujo a la postulación de que la mezcla ineficaz podría conducir a una reacción localizada que favorecía la generación de la bis-hidrazida. Calentar a temperatura ambiente y tratar la reacción como en el Ejemplo 3 proporcionó la bis-hidrazida como el producto principal (82 %, % de área de HPLC). Esto es mucho mayor que el típico nivel no deseado del 20 %. Se concluyó que la solución de cloruro (**2**) de ácido tioéter/CH₂Cl₂ añadida no se mezcla eficazmente con los conglomerados de hidracina.

Ejemplo 5

Efectos de la temperatura en la preparación de *p*-metoxibenciltioéter hidrazida (3)

El Ejemplo 5 repitió la misma reacción del Ejemplo 4, pero se sostuvo a 0 °C, en lugar de a aproximadamente -72 °C. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de ácido tioéter/CH₂Cl₂ a una solución homogénea agitable de hidracina/CH₂Cl₂ (28 % v/v). En este caso, se formó el 39 % (% de área de HPLC) de la bis-hidrazida. Estas condiciones implican que la temperatura más baja y agitación son factores que afectan a la formación del subproducto no deseado. Los resultados de los Ejemplos 3.1 y 3.2 se recogen en la Tabla 3.

TABLA 3 PREPARACIÓN DE P-METOXIBENCILTIOÉTER HIDRAZIDA COMO UNA FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

Ejemplo n.º	Hidracina (ec.)	Hidracina/CH ₂ Cl ₂ (v/v) (%)	Temp (°C)	Bis-hidrazida (%)	Comentarios
3.1	5	28	~ -72	82	Mal agitado
3.2	5	28	~ 0	39	Suspensión agitada

a. El cloruro de ácido se añadió a la mezcla de hidracina/CH₂Cl₂ a una velocidad de 0,25 ml/min.

Ejemplo 6*Efecto de la concentración de hidracina en la preparación de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)*

A continuación se examinó el efecto de usar una concentración más baja de hidracina a baja temperatura. Los resultados se resumen en la Tabla 4 a continuación. Se preparó una mezcla agitada y heterogénea de hidracina/CH₂Cl₂ a -65 a -72 °C diluyendo la hidracina/CH₂Cl₂ a concentraciones del 5 % y 19 % frente al 28 % (v/v). Los experimentos 4.1 y 4.2 de la Tabla 4 llevados a cabo a concentraciones de hidracina/CH₂Cl₂ del 19 % y 5 %, respectivamente, proporcionaron una mezcla heterogénea y agitable que se hizo reaccionar con cloruro de ácido tioéter para proporcionar el producto deseado con niveles del subproducto bis-hidrazida del 3 % y 5 %, respectivamente. La repetición de la misma reacción usando menos hidracina (experimento 4.3 de la Tabla 4 usando 5 frente a 10 equivalentes molares) generó solamente el 3 % de la bis-hidrazida. La cantidad típica de hidracina es de 5 equivalentes molares frente al ácido tioéter. La duplicación de la cantidad de hidracina a 10 equivalentes molares (Tabla 4: experimentos 4.1 y 4.2) no afectó significativamente el nivel de bis-hidrazida en el producto final.

La adición del cloruro de ácido a una velocidad más rápida (véase los experimentos 4.4 y 4.5 de la Tabla 4, que usó 1 frente a 0,25 ml/min) a la mezcla heterogénea diluida de hidracina/CH₂Cl₂ (5 % y 19 %) generó bis-hidrazida a niveles del 3 % y 9 %, respectivamente. La drástica disminución del nivel de la bis-hidrazida (del 82 % al 3 %, véase el experimento 3.1 de la Tabla 3 anterior y el experimento 4.4 de la Tabla 4) podría atribuirse a uno o más de los siguientes factores: temperatura, concentración, cantidad de hidracina, velocidad de adición y mezcla. La bis-hidrazida al 9 % generada a partir del experimento 4.5 de la Tabla 4 podría ser provocada por una agitación ineficaz inicial.

TABLA 4 PREPARACIÓN DE P-METOXIBENCILTIOÉTER HIDRAZIDA BAJO DIVERSAS DILUCIONES DE HIDRACINA/CH₂CL₂

Exp. n.º (Escala de 5 g)	Hidracina (ec.)	Velocidad de adición (ml/min)	Hidracina/CH ₂ Cl ₂ (v/v) (%)	Bis-hidrazida (%)	Comentarios
4.1	10	0,25	19	4	Suspensión agitada
4.2	10	0,25	5	5	Suspensión agitada
4.3	5	0,25	5	3	Suspensión agitada
4.4	5	1,0	5	3	Suspensión agitada
4.5	5	1,0	19	9	Iniciado como suspensión no agitada

La temperatura de reacción durante la adición se mantuvo a -68 a -73 °C.

Ejemplo 7*Efecto de la temperatura en la preparación de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)*

El efecto de la temperatura sobre el nivel de bis-hidrazida en el producto se examinó en la Tabla 5. En experimentos en los que el cloruro de ácido tioéter se añadió a una mezcla agitada de hidracina/CH₂Cl₂ (19 % v/v) a -20 y -72 °C (Tabla 5: experimento 5.1 y 5.2), se generó bis-hidrazida a niveles del 28 % y 4 %, respectivamente. Se observaron resultados similares en los experimentos 5.3 y 5.4 (Tabla 5). Los resultados anteriores indican que es necesaria una temperatura de reacción más baja (~ -70 °C) para obtener niveles más bajos (3-5 %) de la bis-hidrazida.

TABLA 5 EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL NIVEL DE LA BIS-HIDRAZIDA FORMADA

Experimentos ^a (escala de 5 g)	Hidracina/CH ₂ Cl ₂ (v/v) (%)	Temp (°C)	Bis-hidrazida (%)	Comentarios
5.1	19	-20	28	Suspensión agitada
5.2	19	-72	4	Suspensión agitada
5.3	5	-38	16	Suspensión agitada
5.4	5	-72	3	Suspensión agitada

a. Los experimentos anteriores se llevaron a cabo usando 5 eq. de hidracina.

Ejemplo 8*Efecto de la concentración de hidracina en la preparación de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)*

El examen de los experimentos de la Tabla 4 reveló que una temperatura de adición de alrededor de -70 °C y una concentración de hidracina/CH₂Cl₂ al 19 % o al 5 % (v/v) produjeron resultados comparables. Esta observación se examinó adicionalmente en la Tabla 6. En los experimentos 6.1, 6.2 y 6.4 de la Tabla 6, en los que se añadió el cloruro de ácido tioéter a la mezcla heterogénea de hidracina/CH₂Cl₂ en concentraciones del 19 %, 14 % y 10 %, la bis-hidrazida se generó a niveles del 6 %, 13 % y 4 %, respectivamente. El volumen de reacción, el tamaño del matraz y la velocidad de agitación se mantuvieron constantes. Los resultados mostraron que al 19 %, la reacción era comparable a los resultados a una concentración del 10 %. La concentración de hidracina/CH₂Cl₂ del 14 % se repitió a una escala de 30 g (experimento 6.3 de la Tabla 6) para proporcionar el producto deseado contaminado con solamente bis-hidrazida al 3 %. El nivel más alto de bis-hidrazida en el experimento 6.2 se atribuye a la adición rápida inicial del cloruro de ácido que provocó que la temperatura de reacción aumentara a -57 °C antes de que se ajustara rápidamente.

TABLA 6 EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDRACINA/CH₂CL₂ SOBRE EL NIVEL DE LA BIS-HIDRAZIDA FORMADA

Exp n.º ^a (escala)	Hidracina/CH ₂ Cl ₂ (v/v) (%)	Temp (°C)	Bis-hidrazida (%)	Comentarios (vol de líq./tamaño del MFR)
6.1 (5 g)	19	-68 a -70	6	20 ml/100 ml
6.2 (4,2 g)	14	-57 a -65	13	(Adición rápida inicial) 20 ml/100 ml
6.3 (30 g)	14	-68 a -71	3	140 ml/500 ml
6.4 (2,9 g)	10	-61 a -68	4	20 ml/100 ml

a. Los experimentos anteriores se llevaron a cabo usando 5 equivalentes de hidracina

Ejemplo 9*Efecto de la velocidad de mezclado en la preparación de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)*

Se examinó el efecto del mezclado (Tabla 7). Los experimentos 7.2 y 7.1 mostraron que un mezclado más rápido (400 rpm frente a 200 rpm) produjo menor bis-hidrazida (22 % frente a 40 %). El nivel más alto de lo usual de bis-hidrazida en ambos experimentos podría ser provocado por un mezclado ineficaz considerando el nivel de líquido inicial (36 ml) de hidracina/CH₂Cl₂ en el matraz de 50 ml en comparación con 20 ml de líquido en el matraz de 100 ml de la Tabla 8. Esto significa que además de la velocidad del mezclado, se debe considerar la geometría del reactor y el nivel de líquido.

TABLA 7 EL EFECTO DEL MEZCLADO SOBRE EL NIVEL DE LA BIS-HIDRAZIDA FORMADA

Experimento (escala de 5 g)	Hidracina/CH ₂ Cl ₂ (v/v) (%)	Temp (°C)	Bis-hidrazida (%)	Velocidad de adición (ml/min)	Velocidad de mezclado (rpm)
7.1	19	-60	40	1	200
7.1	19	-65	22	1	400

a. El volumen de líquido final/tamaño de reactor fue de 72 %.

Ejemplo 10*Efectos de aumento en la preparación de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)*

La preparación de p-metoxibenciltioéter hidrazida a una concentración de hidracina/CH₂Cl₂ de 19 % o 5 % (v/v) produjo resultados comparables. Mientras que la concentración del 19 % de hidracina/CH₂Cl₂ es normalmente una mezcla agitable a -70 °C, existe el riesgo de que se convierta en una mezcla congelada mal mezclada. Si se llevó a cabo un lote (400 g) a escala de fabricación a una concentración de hidracina/CH₂Cl₂ de 5 %, podría requerirse un reactor mayor (tipo Morton de 20 l). Sin embargo, Si el procedimiento se lleva a cabo a una concentración de 14 % de hidracina/CH₂Cl₂, la reacción puede llevarse a cabo usando un reactor de vidrio y un matraz de fondo redondo tipo Morton de 5 l. Cuando el procedimiento se llevó a cabo a una concentración de 14 % v/v de hidracina/CH₂Cl₂ a una escala de 20 g (experimento 8.1 de la Tabla 8), el producto aislado, p-metoxibenciltioéter hidrazida, se contaminó con 4,4 % (% de área de HPLC) de subproducto, bis-metoxibenciltioéter hidrazida. La repetición de la condición anterior (la concentración de hidracina/CH₂Cl₂ era de 14 %) en condiciones de aumento de fabricación (experimento 8.2 de la Tabla 8) produjo p-metoxibenciltioéter hidrazida contaminada con 4,2 % (% de área de HPLC) de subproducto, bis-metoxibenciltioéter hidrazida.

TABLA 8 PREPARACIÓN DE P-METOXIBENCILTIOÉTER HIDRAZIDA A UNA CONCENTRACIÓN DE HIDRACINA/CH₂CL₂ QUE FUE DEL 14 %

Exp. n.º	Tamaño del matraz	Nivel de líq. inicial/tamaño del reactor	% de área de HPLC de bis-hidrazida
(Escala)	(ml)	(%)	(%)
8.1 ^a (20 g)	250	39 ^c	4,4
(Escala)	(ml)	(%)	(%)
8.2 ^b (400 g)	5000 (Morton)	39 ^c	4,2

a. La concentración de la mezcla de hidracina/CH₂Cl₂ es de 14 % (v/v)
b. La concentración de la mezcla de hidracina/CH₂Cl₂ es de 14 % (v/v).
c. El volumen inicial del tamaño del reactor = 39 %. El volumen de líquido final/tamaño de reactor = 64 %.

El procedimiento original (Tabla 9, experimento 9.1), proporcionó el producto, *p*-metoxibenciltioéter hidrazida, en una concentración de 78,4 % que contenía 19,3 % de subproducto, bis-hidrazida. El procedimiento modificado en el Experimento 9.2, Tabla 9, usó la adición continua de una solución de cloruro de ácido metoxibenciltioéter a una mezcla heterogénea de hidracina/cloruro de metileno (la concentración fue de 14 %) más diluida y agitable. El producto, *p*-metoxibenciltioéter hidrazida, se preparó en una concentración de 91,1 % que contenía 4,7 % de subproducto, bis-hidrazida.

TABLA 9 COMPARACIÓN ENTRE EL PROCEDIMIENTO MODIFICADO Y EL PROCEDIMIENTO ANTERIOR DE LA PREPARACIÓN DE P-METOXIBENCILTIOÉTER HIDRAZIDA

Procedimiento (escala)	Velocidad de mezclado (RPM)	Tamaño del matraz (ml)	<i>p</i> -metoxibenciltioéter hidrazida (concentración %)	Bis-hidrazida (%)
9.1 ^a 400 g	nd	5.000 ^c (Morton)	78,4	19,3
9.2 ^b (400 g)	270	5.000 ^d (Morton)	91,1	4,7

a. La concentración de la mezcla de hidracina/CH₂Cl₂ es de 28% (v/v)
b. La concentración de la mezcla de hidracina/CH₂Cl₂ es de 14 % (v/v).
c. El volumen inicial/ tamaño del reactor fue de 21 %. El volumen de líquido final/tamaño de reactor = 47 %.
d. El volumen inicial/ tamaño del reactor fue de 39 %. El volumen de líquido final/tamaño de reactor = 64%.

Las siguientes condiciones aseguran que se forme un bajo nivel del subproducto bis-hidrazida y se recomiendan para la fabricación del *p*-metoxibenciltioéter hidrazida. Estas condiciones de reacción son consideradas aspectos de determinadas realizaciones de la presente invención:

1. Velocidad de adición de la solución de cloruro de ácido metoxibenciltio a la mezcla de hidracina/CH₂Cl₂ ajustada para mantener la temperatura de reacción de -68 a -75 °C.
2. Mezclado efectivo (volumen de líquido inicial de 30 a 40 % del volumen líquido frente al tamaño del reactor) a una alta velocidad de mezclado (300 a 400 rpm). Mezclado mantenido a una velocidad de 260-270 rpm en un matraz de tipo Morton de 5 l.
3. Mezcla uniforme y agitable de hidracina/CH₂Cl₂ (la concentración fue de 5 a 19 % v/v. En un ejemplo, la relación de hidracina/CH₂Cl₂ fue de 14 % v/v.
4. Volumen de líquido inicial del 30 a 40 % del volumen líquido frente al tamaño del reactor.

Los siguientes Ejemplos 11-15 se combinan para ilustrar una realización preferente de la invención.

Ejemplo 11

Preparación modificada del producto intermedio del ácido p-metoxibenciltioéter (1)

Se estableció un matraz de reacción de 5 l con un condensador, una entrada de N₂, un agitador y una sonda/controlador de la temperatura. Se cargó piperidina (0,402 kg) en el vaso bajo una atmósfera de N₂. Se añadió ácido 3,3-dimetilacrilico (0,215 kg) en porciones con agitación seguido de *p*-metoxibenciltiol (0,358 kg). La mezcla de reacción se calentó gradualmente a 82 a 88 °C durante un mínimo de 15 minutos y se mantuvo esa temperatura de reacción hasta que se observó una reacción exotérmica. La temperatura no se dejó exceder de 95 °C. Cuando la reacción exotérmica fue completa, se continuó el calentamiento a 92 a 98 °C y se mantuvo durante un mínimo de 15 horas.

Se prepararon tres litros de HCl acuoso 3M. El manto calefactor se retiró y la mezcla de reacción se dejó enfriar a 70 a 75 °C. Se añadió lentamente 1,9 l de la solución de HCl. El enfriamiento se continuó con un baño de agua hasta que el contenido del matraz alcanzó una temperatura de 20 a 30 °C. Se añadió CH₂Cl₂ (1,64 kg) y el contenido del matraz se agitó durante un mínimo de 5 minutos. El pH se verificó y se ajustó a < 2 según fuera necesario usando la solución de HCl. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación, las fases se dejaron separar y la capa del producto orgánica inferior se drenó de nuevo en el matraz de reacción. La capa acuosa superior se

transfirió a un matraz separado. La solución de HCl restante se añadió a la fase orgánica y se agitó durante un mínimo de 5 minutos. El pH se verificó y se ajustó a < 2 según fuera necesario con una solución de HCl 3 M.

El contenido del matraz de reacción se devolvió al embudo de decantación y se dejó separar las capas durante un mínimo de cinco minutos. La fase orgánica inferior se drenó a un matraz Erlenmeyer limpio y la capa acuosa se drenó al matraz de reacción. La fase acuosa de la extracción anterior se añadió al matraz de reacción, así como el CH₂Cl₂ (0,400 kg). La reacción se agitó durante un mínimo de 5 minutos, a continuación el contenido del matraz de reacción se transfirió al embudo de decantación y se dejó separar las capas durante un mínimo de cinco minutos. La fase del producto orgánica inferior se combinó con la fase del producto orgánica anterior y se transfirió al matraz de reacción. Las fases acuosas combinadas se desecharon como residuo. Se cargó agua (1,00 kg) en el matraz de reacción y se agitó durante un mínimo de 5 minutos. La mezcla se transfirió al embudo de decantación y se dejó separar las fases durante un mínimo de cinco minutos. La fase inferior orgánica del producto se drenó a un matraz Erlenmeyer limpio. La fase acuosa combinada se desechó como residuo. La solución orgánica del producto se secó sobre MgSO₄ anhidro, a continuación se filtró por succión en un matraz de 5 l de 4 bocas.

El matraz Erlenmeyer y la torta de filtración se enjuagaron en el matraz de 5 l de 4 bocas con CH₂Cl₂ (0,350 kg). El CH₂Cl₂ se separó por destilación a un volumen de recipiente de 900 ± 50 ml. La temperatura del concentrado se ajustó a 15 a 20 °C y a continuación se precipitó añadiendo heptano (1,67 kg). La mezcla se enfrió a aproximadamente 5 °C y se agitó durante un mínimo de 30 minutos, a continuación el lote se filtró por succión y la torta del producto se enjuagó con heptano (2 x 0,272 kg). El producto se muestreó para la pérdida en el análisis de secado (LOD) y el filtrado se muestreó para la proyección de contenido de sólidos. Si el filtrado contiene > 0,110 kg, entonces se concentra y se trata con heptano para precipitar un segundo cultivo del producto como antes. La (s) torta (s) del producto húmedo se pesaron y el peso seco se calculó usando los datos LOD. La masa seca del producto era equivalente a una constante **A** (kg). El producto húmedo se devolvió al matraz de 5 l y se disolvió en CH₂Cl₂ (1,76 x **A** kg mínimos, 2,20 x **A** kg máximos). Se añadió heptano (4,56 x **A** kg) lentamente, lo que inició la precipitación. La suspensión se enfrió a 0 a 5 °C y luego se envejeció durante un mínimo de 30 minutos. El lote se filtró por succión y la torta del producto se enjuagó con heptano (2 porciones, cada una de 0,272 kg). La filtración se continuó hasta que el flujo filtrado esencialmente se detuvo.

La torta del producto húmedo se transfirió a un plato (s) tarado (s) y se obtuvo un peso, a continuación, los filtrados se transfirieron a un recipiente de residuos apropiado. La torta se secó en un horno de vacío a no más de 38 °C hasta que se alcanzó una pérdida en la especificación de secado LOD <1,0 %. La muestra se sometió a análisis.

30 Ejemplo 12a

Preparación del cloruro (2) de ácido p-metoxibenciltioéter

Se estableció un matraz de reacción de 5 l equipado con un condensador, una torre de lavado de agua, una sonda de temperatura, un embudo de adición de 1 l, una entrada de N₂ y un agitador. Se cargó CH₂Cl₂ (1,6 kg) bajo una atmósfera de N₂ seguido de ácido p-metoxibenciltioéter (0,400 kg) con agitación. Se preparó una solución de cloruro de oxalilo (0,220 kg) y CH₂Cl₂ (0,600 kg) en el embudo de adición. Se añadió aproximadamente la mitad de la solución de cloruro de oxalilo mientras se mantenía un intervalo de temperatura de 20 a 30 °C (reacción exotérmica). Se observó la evolución de CO₂/CO mientras se agitaba durante un mínimo de 30 minutos, a continuación se añadió la solución de cloruro de oxalilo restante, mientras se mantenía la temperatura entre 20 y 30 °C. La reacción se agitó hasta que la liberación de gas disminuyó (aproximadamente 30 minutos), entonces la mezcla se calentó a 33 a 38 °C. Esta temperatura se mantuvo durante aproximadamente 60 minutos hasta que la liberación de gas disminuyó. La reacción se muestreó, y se usó HPLC para determinar la cantidad de ácido restante. La reacción se consideró completa cuando la cantidad de material de partida no era más del 5 %. Si la reacción no era completa, se continuó entonces la agitación a 33 a 38 °C durante una hora adicional, después se muestreó y se ensayó de nuevo. El manto calefactor se retiró y la mezcla de reacción se dejó enfriar a 20 a 30 °C. La mezcla se transfirió a un matraz de 3 l de una sola boca, a continuación se aclaró con CH₂Cl₂. El lote se concentró en un evaporador rotatorio hasta que se eliminaron la mayoría de los volátiles.

Ejemplo 12b

Preparación del producto intermedio de p-metoxibenciltioéter hidrazida (3)

Se estableció un matraz de reacción de 4 bocas tipo Morton de 5 l con condensador, entrada de N₂, termopar, agitador y embudo de adición de 2 l. Se cargó CH₂Cl₂ (2,40 kg) bajo una atmósfera de N₂ y se enfrió a -75 a -65 °C. Se cargó hidracina anhidra (0,252 kg) para dar una suspensión uniforme de hielo de hidracina, sin formación de cristales de hidracina en las paredes laterales del matraz. La solución de cloruro de ácido tioéter se transfirió al embudo de adición, enjuagando en CH₂Cl₂ según fuera necesario para dar un volumen de solución de 1,30 l.

La solución de cloruro de ácido se añadió gota a gota a una velocidad constante durante un mínimo de tres horas mientras se mantenía la temperatura entre -65 a -75 °C (preferentemente entre -70 a -75 °C). Después de completarse la adición, la reacción se agitó a -65 y -75 °C durante un mínimo de 30 minutos. El lote se calentó a 20 a 25 °C. La reacción se muestreó por HPLC y se consideró completa si la cantidad de cloruro de ácido restante no era más del 5 %. Si la reacción era incompleta en este punto, la agitación se continuó a 20 a 25 °C durante un

mínimo de una hora, luego se muestreó de nuevo. El lote de un matraz de 3 l se concentró en el evaporador rotatorio. El lote se enjuagó en el matraz con CH_2Cl_2 según se requería. El concentrado se diluyó con MeOH (1,25 kg) y se transfirió a un matraz de reacción de 5 l equipado con agitador, termopar y entrada de N_2 , enjuagado con MeOH según se necesitó.

- 5 Se añadió una solución de NaOH (0,0640 kg) en MeOH (1,25 kg) bajo una atmósfera de N_2 y se agitó durante un mínimo de 20 minutos. El lote se clarificó por filtración por succión y se aclaró según se requirió con MeOH. El filtrado se transfirió a un matraz de 3 l tarado (enjuagado con MeOH según se requiera) y se concentró en el evaporador rotatorio hasta que se eliminaron todos los volátiles, después se continuó bajo vacío durante un mínimo de 30 minutos. Se interrumpió la aplicación de vacío y se añadió CH_2Cl_2 (0,704 kg). Se continuó la rotación para efectuar la disolución del concentrado, a continuación se reanudó la aplicación de vacío y se concentró hasta un residuo sólido. Se obtuvo el peso del residuo y el residuo se transfirió a un embudo de decantación usando CH_2Cl_2 (2,84 kg). La mezcla se agitó para dar una solución.

- 15 La solución de CH_2Cl_2 se lavó con dos porciones de agua (1,00 kg cada una). Se añadió MgSO_4 anhidro (0,300 a 0,420 kg) a la solución de CH_2Cl_2 y se agitó en círculos durante aproximadamente quince minutos hasta que se aclaró la solución. El lote se filtró por succión, enjuagándose con CH_2Cl_2 según se requería. El filtrado se transfirió a un matraz de 3 l tarado y se concentró en un evaporador rotatorio hasta un residuo sólido. Se obtuvo el peso del residuo, y se disolvió en CH_2Cl_2 (no inferior a 0,532 kg). La solución se transfirió a un embudo de adición de 1 l que estaba unido a un matraz de reacción de 12 l de 4 bocas equipado con un agitador, un termopar y una entrada de N_2 . Se cargó éter (3,04 kg) en el matraz bajo una atmósfera de N_2 . El éter se enfrió a 0 a $-10\text{ }^\circ\text{C}$.

- 20 La solución *p*-metoxibenciltioéter hidrazida se añadió al disolvente de éter que se agitaba rápidamente mientras se mantenía la temperatura entre -10 y $0\text{ }^\circ\text{C}$. La solución adicional se enjuagó en el matraz usando CH_2Cl_2 (0,0660 kg). Se cargó heptano (0,732 kg) al embudo de adición y se añadió lentamente a la suspensión fina, manteniendo de nuevo el mismo intervalo de temperatura. La suspensión resultante se agitó a la misma temperatura durante un mínimo de 60 minutos. El lote se filtró por succión a través de papel. La torta del producto se enjuagó con heptano (2 porciones, cada una de 0,366 kg) y se secó por succión hasta formar una torta húmeda. La torta húmeda se transfirió a platos tarados y se obtuvo el peso de la torta. La torta se secó en un horno de vacío (a no más de $38\text{ }^\circ\text{C}$) hasta que LOD no fue más del 2,0 %. Se obtuvo el peso de la *p*-metoxibenciltioéter hidrazida seca y las muestras se sometieron a ensayo.

Ejemplo 13

- 30 *Preparación del producto intermedio (4) desprotegido en tiol*

Se preparó la resina de intercambio aniónico Dowex SRB OH añadiendo 2,4 kg de la resina a un embudo de Büchner grande y lavando con agua (4 porciones, 2,40 kg cada una) luego MeOH (4 porciones, cada una de 1,92 kg). La resina se cubrió con agua en un vaso de precipitados y se remojó durante un mínimo de una hora, a continuación, el agua se separó por filtración. La resina se transfirió a un recipiente de almacenamiento apropiado. Se estableció un matraz de reacción de 5 l equipado con un agitador, un termopar, una entrada de N_2 y un embudo de adición de 250 ml. Se cargó ácido trifluoroacético (2,80 kg) bajo una atmósfera de N_2 y se enfrió a 5 a $10\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadió hidrazida de tioéter (0,380 kg) en porciones (reacción exotérmica), mientras se mantenía la temperatura entre 5 y $15\text{ }^\circ\text{C}$. La solución se enfrió a 0 a $5\text{ }^\circ\text{C}$.

- 40 Se cargó ácido trifluorometanosulfónico (0,243 kg) en el embudo de adición y se añadió a la mezcla de reacción, mientras se mantenía la temperatura entre 0 y $10\text{ }^\circ\text{C}$. Después de completarse la adición, se añadió anisol (0,0152 kg). La mezcla de reacción se agitó a 10 a $15\text{ }^\circ\text{C}$ durante un mínimo de dos horas o hasta que el color de la reacción era de color rojo intenso y no cambió más. La reacción se muestreó y se ensayó por TLC y se consideró completa si la mezcla de reacción contenía no más del 4 % de material de partida. Se estableció un matraz de reacción de 12 l equipado con un agitador, una entrada de N_2 y un embudo de adición de 2 l. Se cargó MeOH (3,01 kg). El vaso se enfrió a 0 a $5\text{ }^\circ\text{C}$ bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se transfirió al embudo de adición y después se añadió al MeOH enfriado a una velocidad moderada, manteniendo una temperatura de reacción de 0 a $5\text{ }^\circ\text{C}$. Se formó un precipitado blanco. El matraz de reacción se enjuagó en el embudo de adición con MeOH adicional (0,0790 kg). La suspensión blanca se agitó durante aproximadamente 15 minutos a 0 a $5\text{ }^\circ\text{C}$. El lote se filtró por succión a través de papel y la torta del producto se enjuagó con MeOH (2 porciones, cada una de 0,600 kg). Después de que el flujo de filtrado a través de la torta se hubiera detenido esencialmente, el filtrado se transfirió a un matraz de 3 l tarado (enjuagado con MeOH según se requirió) y se concentró en el evaporador rotatorio hasta un residuo semisólido.

- 55 El residuo se volvió a disolver en MeOH (0,600 kg) y se concentró de nuevo como antes. El residuo se volvió a disolver en CH_2Cl_2 (0,600 kg), se concentró de nuevo como antes y se obtuvo el peso del residuo. El residuo se disolvió en agua (1,52 kg) y la solución se transfirió a un embudo de decantación de 6 l. El residuo se lavó con CH_2Cl_2 (tres porciones, cada una de 0,927 kg). Las fases orgánicas combinadas se transfirieron a un recipiente de residuos apropiado. La fase acuosa que contenía el producto se transfirió a un vaso de precipitados y el pH se ajustó a 6,5 a 7,5 unidades de pH mediante la adición de la resina hinchada. El pH se ajustó con ácido trifluoroacético según se necesitaba. Una vez que se consiguió el intervalo de pH deseado, la suspensión se agitó durante

aproximadamente 30 minutos, y se verificó de nuevo el pH, y se ajustó si era necesario. El lote se filtró por succión y la resina se enjuagó con agua (2 porciones, cada una de 0,600 kg). Se añadió una solución de HCl al 37 % (0,160 kg). El pH se midió para asegurar que era <1,5. Se añadió HCl adicional si era necesario. La solución acuosa se transfirió a un matraz de 3 l tarado (se enjuagó con agua según se requirió) y se concentró hasta un residuo sólido en el evaporador rotatorio. Se obtuvo el peso del residuo. El residuo se disolvió en EtOH anhidro (1,20 kg) y se concentró de nuevo. El residuo se volvió a disolver en EtOH anhidro (1,65 a 2,85 kg) y se calentó a 50 a 65 °C. La solución caliente se filtró por succión. El filtrado se transfirió a un matraz de 3 l tarado y la solución de etanol se concentró en un evaporador rotatorio hasta que la destilación cesó esencialmente. Se cargó EtOAc (8,21 kg) en porciones y se concentró como antes. Se cargó una cuarta parte de EtOAc (2,74 kg) y se enfrió a 20 a 25 °C. La reacción se agitó durante aproximadamente 15 minutos. El lote se filtró por succión y se enjuagó con EtOAc (2 porciones, cada una de 0,135 kg). La succión se continuó hasta que el flujo del filtrado se detuvo esencialmente. La torta se secó por succión durante aproximadamente 60 minutos. El filtrado se desechó.

Se obtuvo el peso de la torta del producto húmedo y se usó esa masa (kg) en cálculos posteriores como una constante B. El producto se transfirió a un matraz de reacción de 12 l equipado con un condensador, un agitador, una entrada de N₂ y un termopar. Se cargó EtOAc (45,1 x B kg) bajo N₂ y la suspensión se calentó a 48 a 53 °C con agitación. El calentamiento se interrumpió tras alcanzar los 50 °C. El manto calefactor se retiró y la suspensión se enfrió a 20 a 25 °C. El lote se filtró por succión y se aclaró con EtOAc (2 porciones, cada una de 0,270 kg). La succión se continuó hasta que el flujo del filtrado se detuvo esencialmente. La torta de filtración se secó en un horno de vacío a no más de 38 °C durante un mínimo de 12 horas. Se obtuvo el peso de la torta de filtración y se usó la masa del producto (kg), equivalente a una constante C, en cálculos posteriores.

Ejemplo 14

Preparación de la hidrazida de base libre (5)

El producto (4) de la sal de hidrocloruro bruto se mezcló con agua (20,0 x C kg) en un matraz de reacción de 12 l de 4 bocas y se agitó para dar una solución. El pH de la solución se ajustó con la resina tratada hasta que se consiguió un intervalo de 6,5 a 7,5 unidades de pH. El lote se agitó durante aproximadamente 15 minutos, luego se verificó de nuevo el pH y se ajustó según se necesitó para obtener un valor de 6,5 a 7,5 unidades de pH. El lote se filtró por succión y se enjuagó con agua (3,0 x C kg), después con EtOH anhidro (2 porciones, cada una de 5,30 x C kg). La filtración por succión se continuó hasta que el flujo de filtrado se detuvo esencialmente. El producto filtrado se transfirió a un matraz de 3 l tarado y se enjuagó con EtOH anhidro según se requirió. El lote se concentró en el evaporador rotatorio hasta que la destilación se detuvo esencialmente. El residuo del producto se volvió a disolver en EtOH anhidro (1,58 x C kg) y se concentró como antes. El residuo del producto se volvió a disolver en éter anhidro (2,57 x C kg) y se concentró como antes. Una vez que la destilación se detuvo esencialmente, el secado se continuó con alto vacío y la evaporación continuó durante un mínimo de dos horas. El peso neto del residuo fue una constante D. El concentrado se transfirió a un matraz de reacción de 12 l equipado con un conjunto agitador, una sonda de temperatura y una entrada de nitrógeno usando CH₂Cl₂ (66,3 x D kg). La mezcla se agitó a 15 a 30 °C durante un mínimo de 30 minutos. El lote se filtró, recogiendo los filtrados en un segundo matraz de reacción de 12 l. El primer matraz se enjuagó en el segundo matraz a través del filtro usando CH₂Cl₂ (3,98 x D kg). El segundo matraz que contenía el lote estaba equipado con un conjunto agitador, una sonda de temperatura y una entrada de nitrógeno. Se cargó gel de sílice (0,700 x D kg) con agitación y la agitación continuó durante aproximadamente 30 minutos. El lote se filtró por succión y la sílice se lavó con CH₂Cl₂ (2 porciones, cada una de 3,98 x D kg), recogiendo los filtrados combinados en un matraz de succión de 10 l. El lote se concentró en un evaporador rotatorio en un matraz de 1 l a aproximadamente 30 °C. El matraz de 10 l se enjuagó en el evaporador según se requirió con CH₂Cl₂. La destilación se continuó hasta que se detuvo esencialmente. El evaporador rotatorio se cambió a una fuente de alto vacío y la evaporación continuó aproximadamente tres horas a 35 a 40 °C.

El aceite del producto cristalizó ajustando el baño del evaporador rotatorio a 0 a 5 °C mientras se hacía girar el matraz a la máxima velocidad. La evaporación se continuó durante aproximadamente 30 minutos después de solidificar el producto. El producto de base libre (5) se muestreó y se ensayó para determinar el cloruro de metileno residual y se secó hasta que el ensayo para determinar el disolvente residual fue aceptable. Se obtuvo el peso final, el producto se embolsó en botellas de vidrio ámbar con tapas que tenían revestimientos inertes y las muestras se sometieron a ensayo.

RENDIMIENTO

El límite del rendimiento global del procedimiento de 5 etapas no es inferior al 33 % de la teoría (0,105 kg) y la diferencia entre el rendimiento más alto y el más bajo no debe ser superior al 15 %. El límite para el primer procedimiento fue del 33 al 43 % de la teoría; sin embargo, se espera que la reducción en la formación de subproductos proporcionada por el aumento de cloruro de metileno en la reacción de formación de hidrazida provocará un aumento del rendimiento. Los rendimientos reales en los lotes de validación se usarán para definir un intervalo de rendimiento para los lotes de producción.

Ejemplo 15*Purificación final de la hidrazida del ácido 3-metil-3-mercaptoputanoico, CI-332258 (engarce de DMH)*

Se cargó cloruro de metileno (1.000 ml, 1.325 g) en un matraz de reacción de 2 l de 4 bocas equipado con un agitador mecánico, una entrada de N₂, un condensador de reflujo y un dispositivo de control de temperatura. Se cargó un engarce de DMF (20 g) en un matraz de reacción. Bajo N₂, la suspensión se agitó a 20 ± 3 °C durante un mínimo de 30 minutos. La solución turbia resultante del engarce de DMH se filtró a través de un embudo Buchner de vidrio sinterizado mediano de 350 ml. El filtrado se recogió en un matraz de fondo redondo de 2 l de 4 bocas equipado con un agitador mecánico, una entrada de N₂, un condensador de reflujo y un dispositivo de control de temperatura. El matraz de reacción se enjuagó en el matraz de reacción limpio con 20 ml, 26,5 g de cloruro de metileno. Se cargó gel de sílice (20 g) a la solución en el matraz de reacción mientras se mantenía la temperatura a 15-25 °C. La suspensión se agitó bajo N₂ a 20 ± 3 °C durante un mínimo de 30 minutos. La mezcla heterogénea se filtró a través de un embudo Buchner de vidrio sinterizado (350 ml mediano). El filtrado se recogió en un matraz de fondo redondo de 2 l limpio de una sola boca. El matraz de reacción se enjuagó de la torta de filtración con cloruro de metileno (50 ml, 66,3 g), recogiendo el filtrado en el matraz de una sola boca. El filtrado se concentró hasta sequedad usando un evaporador rotatorio (baño = 35 ± 5 °C) y un aspirador de agua mecánico de 15-30 mm Hg, seguido de alto vacío (7-10 mm Hg). El sólido blanco resultante se enfrió a 0-5 °C y se secó a alto vacío a 7 mm Hg durante 2 horas. Se cargó n-heptano (100 ml, 68,4 g) al sólido duro y se agitó a temperatura ambiente durante un mínimo de 10 minutos hasta que se obtuvo una suspensión uniforme.

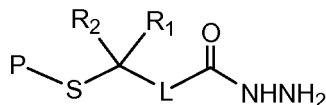
El producto se aisló por filtración por succión a través de papel de filtro (#1 Whatman) en un embudo Buchner de 15 cm. El matraz de 2 l se enjuagó de la torta de filtración con las aguas madre del n- heptano, seguido de 2 x 50 ml, 2 x 34,2 g de lavados de n- heptano. La torta de filtración se secó con succión a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 minutos. La torta de filtración se transfirió a una botella de color ámbar colocada en un desecador de vacío y la torta húmeda se secó 14,34 g hasta un peso constante *bajo vacío* (<10 mm Hg) a 20-25 °C durante 3 horas. Rendimiento: 14,21 g. 75,9 %, rendimiento teórico: 18,7 g.

Ensayo	Procedimiento	Límite tentativo	Encontrado
Concentración	HPLC, L18284-154	95%	102,8%
Pureza	HPLC, L18284-148	5 %	1,34 %
El imp. más grande	HPLC, L18284-148	5 %	1,03 %
Punto de fusión	USP	TBD	51,5-52 °C

25

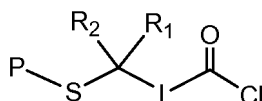
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una hidrazida de estructura:



5 en la que P es un grupo protector de tior que es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido en el anillo de fenilo; R₁ y R₂ se seleccionan cada una del grupo que consiste en alquilo C₁-C₅; y L es una engarce de alquilenos,

a partir de hidrazida y un cloruro de acilo de estructura:



que comprende las etapas de:

10 (a) preparar una suspensión agitada sustancialmente uniforme que comprende hidracina y un disolvente inerte en una relación de entre 5:95 y 19:81, en volumen, enfriando el disolvente inerte a una temperatura de entre -68 y -75 grados C, seguido de la adición gota a gota de hidracina al disolvente inerte frío; y (b) añadir el cloruro de acilo continuamente a dicha suspensión en el que la adición continua de cloruro de acilo se ajusta para mantener una temperatura de reacción de entre -68 °C y -75 °C.

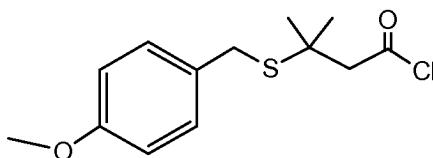
15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el cloruro de acilo se añade sustancialmente gota a gota a la suspensión.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que L es -CH₂-.

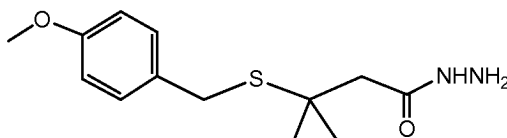
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 en el que R₁ y R₂ son cada uno independientemente metilo.

20 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que P es el grupo *p*-metoxibencilo.

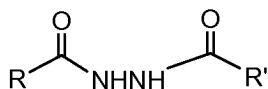
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el cloruro de acilo tiene la estructura:



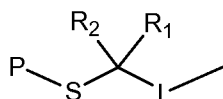
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que la hidrazida deseada es



25 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la hidrazida contiene menos del 5 % de un subproducto bis-hidrazida que tiene la estructura:



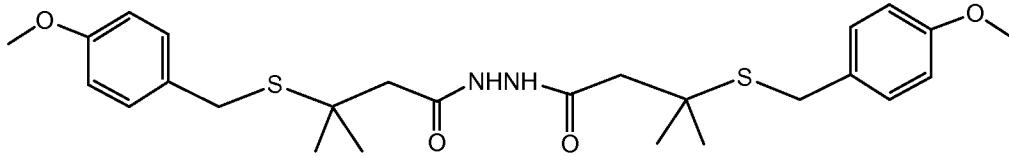
en la que R y R' son



30

y en la que P, R₁, R₂, y L son como se definieron en la reivindicación 1.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el subproducto bis-hidrazida tiene la estructura:



5 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que la suspensión sustancialmente uniforme que comprende hidracina y un disolvente inerte se prepara en una relación de aproximadamente 14:86, en volumen.

11. Un procedimiento de preparación de hidrazida de ácido 3-metil-3-mercaptobutanoico que comprende la etapa de preparación de una hidrazida de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 5.

10 12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que la hidrazida del ácido 3-metil-3-mercaptobutanoico se usa como engarce para fabricar gemtuzumab ozogamicina (marca comercial MYLOTARG) o inotuzumab ozogamicina.

FIGURA 1

Ácido *p*-metoxibencilioéter

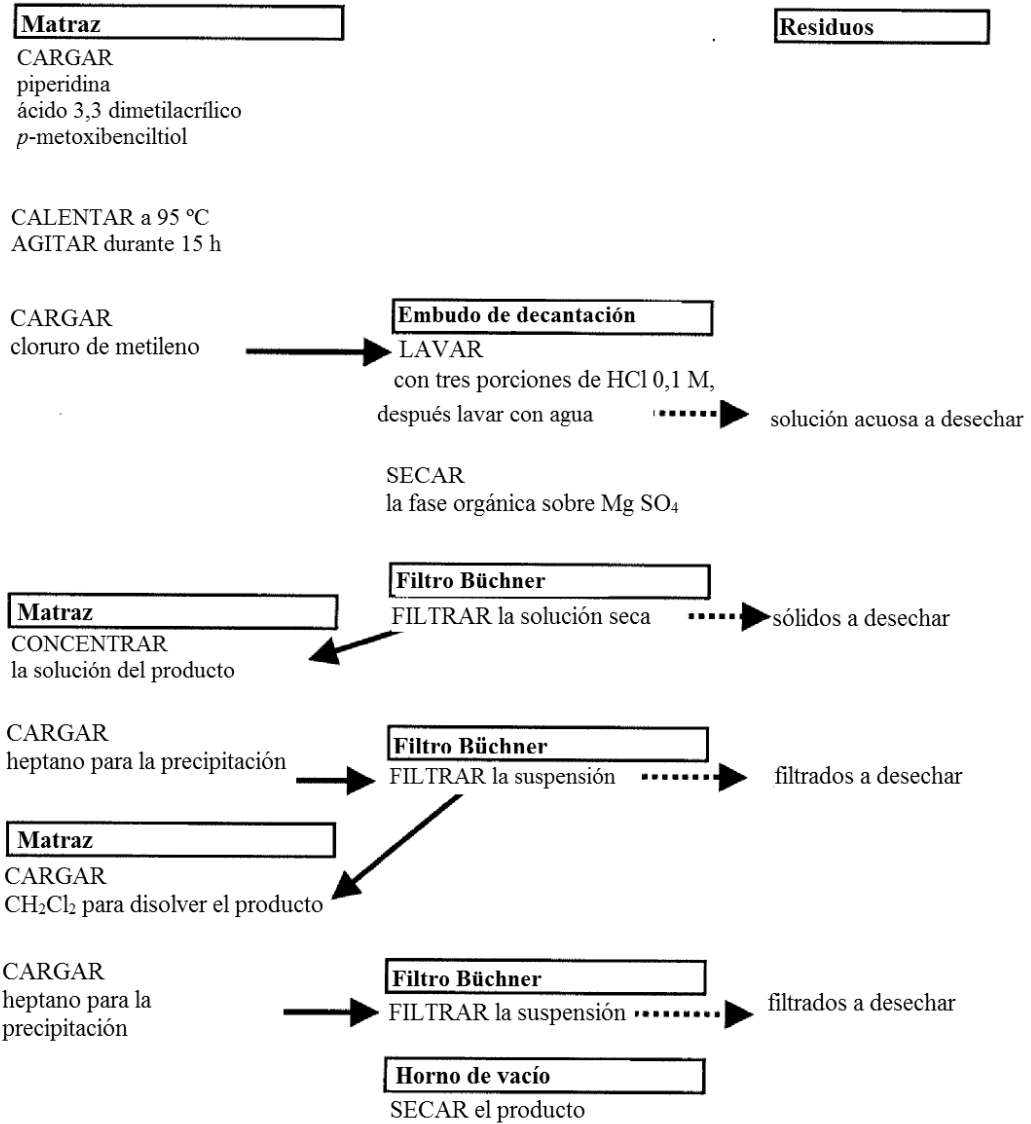


FIGURA 2

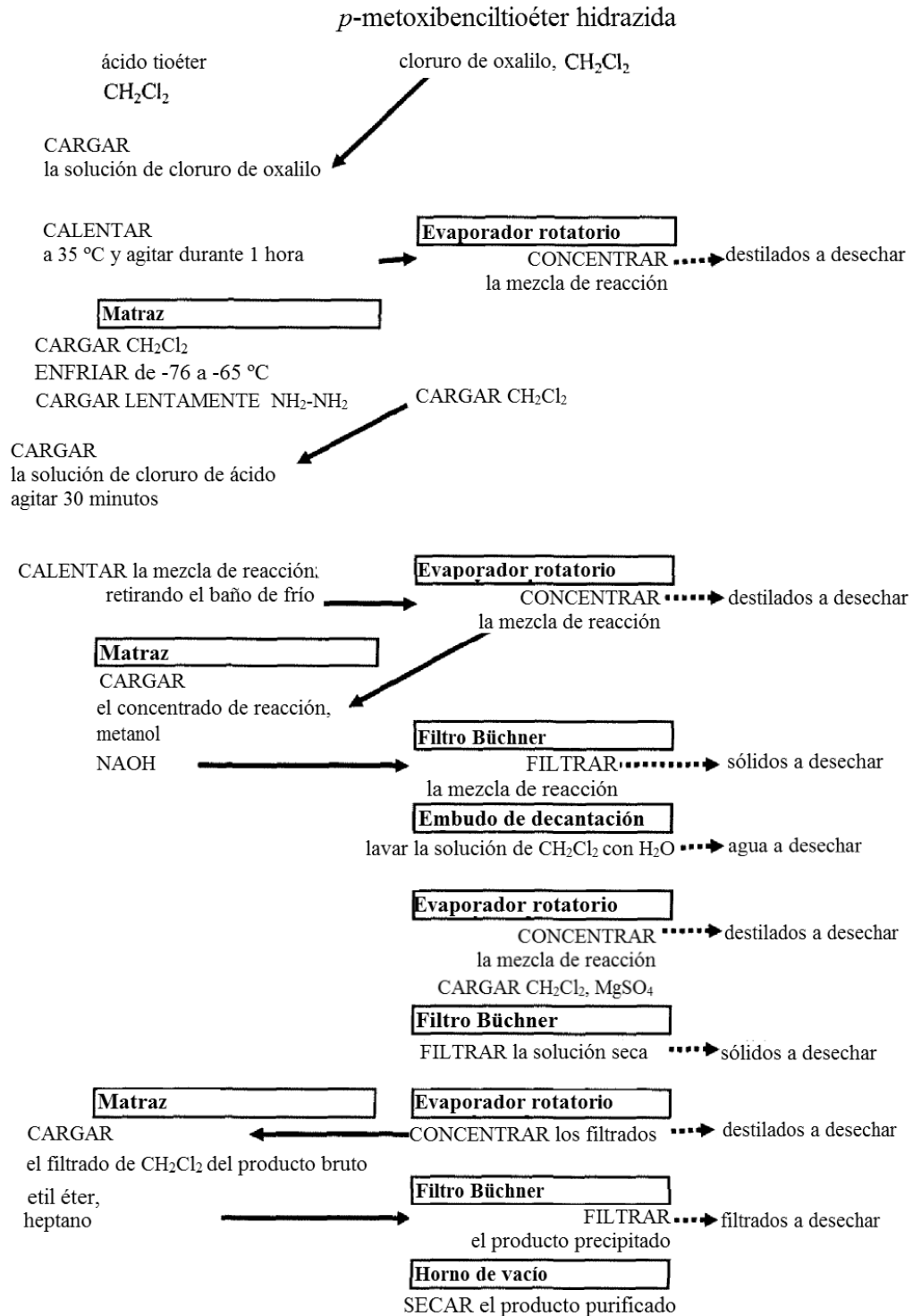


FIGURA 3

