

PROCESO DE PREPARACIÓN DEL INHIBIDOR DE INMUNOPROTEASOMA DE PÉPTIDO EPOXICETONA, Y SUS PRECURSORES

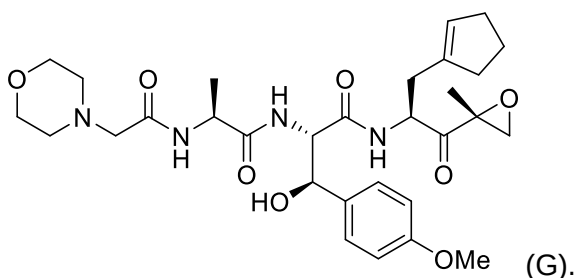
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO TÉCNICO

[0001] La descripción se refiere a métodos y procesos de preparación de (2*S*,3*R*)-*N*-[(2*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-[(2*R*)-2-metiloxiran-2-il]-1-oxopropan-2-il]-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-[(2*S*)-2-[2-(morfolin-4-il)acetamido]propanamido]propanamida, y sus precursores.

DESCRIPCIÓN DE LA TECNOLOGÍA RELACIONADA

[0002] El compuesto, (2*S*,3*R*)-*N*-[(2*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-[(2*R*)-2-metiloxiran-2-il]-1-oxopropan-2-il]-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-[(2*S*)-2-[2-(morfolin-4-il)acetamido]propanamido]propanamida ("compuesto G"), es útil como un inhibidor de inmunoproteasoma:



[0003] En eucariotas, la degradación de proteínas está predominantemente mediada a través de la vía de la ubiquitina en la que las proteínas dirigidas para la destrucción están ligadas al polipéptido de 76 aminoácidos ubiquitina. Una vez dirigidas, las proteínas ubiquitinadas luego sirven como sustratos para el proteasoma 26S, una proteasa multicatalítica, que escinde las proteínas en péptidos cortos a través de la acción de sus tres actividades proteolíticas principales. Aunque tiene una función general en el recambio de proteínas intracelulares, la degradación mediada por proteasoma también desempeña un papel clave en muchos procesos tales como la presentación del antígeno de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), apoptosis, regulación del crecimiento celular, activación de NF- κ B, procesamiento del antígeno y transducción de señales proinflamatorias.

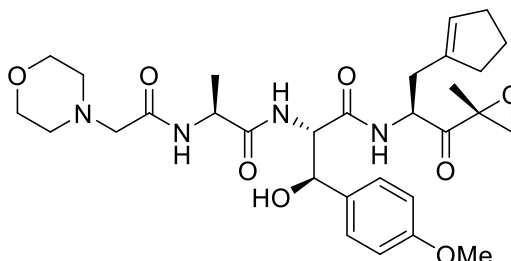
[0004] El proteasoma 20S es un complejo de proteasa multicatalítica de forma cilíndrica de 700 kDa compuesto de 28 subunidades organizadas en cuatro anillos. En las levaduras y otros eucariotas, 7 subunidades diferentes forman los anillos exteriores

y 7 subunidades β diferentes comprenden los anillos internos. Las subunidades α sirven como sitios de unión para los complejos reguladores 19S (PA700) y 1 IS (PA28), así como una barrera física para la cámara proteolítica interna formada por los dos anillos de subunidad β . En consecuencia, *in vivo*, se considera que el proteasoma existe como una partícula 26S ("el proteasoma 26S"). Los experimentos *in vivo* han mostrado que la inhibición de la forma 20S del proteasoma se puede correlacionar fácilmente con la inhibición del proteasoma 26S. La escisión de prosequencias amino-terminales de las subunidades β durante la formación de partículas expone los residuos de treonina amino-terminal, que sirven como nucleófilos catalíticos. Las subunidades responsables de la actividad catalítica en los proteasomas de este modo poseen un residuo nucleofílico amino terminal, y estas subunidades pertenecen a la familia de las hidrolasas nucleofílicas (Ntn) N-terminales (donde el residuo N-terminal nucleofílico es, por ejemplo, Cys, Ser, Thr, y otros restos nucleofílicos). Esta familia incluye, por ejemplo, penicilina G acilasa (PGA), penicilina V acilasa (PVA), glutamina PRPP amidotransferasa (GAT), y glicosilasparaginasa bacteriana. Además de las subunidades β expresadas de forma ubicua, los vertebrados superiores también poseen tres subunidades β inducibles por interferón- γ (LMP7, LMP2 y MECL1), que reemplazan sus equivalentes normales, B5, B1 y B7 respectivamente, de este modo se alteran las actividades catalíticas del proteasoma. A través del uso de diferentes sustratos peptídicos, se han definido tres actividades proteolíticas principales para actividad el proteasoma eucariota 20S: tipo quimotripsina (CT-L), que escinde después de grandes residuos hidrofóbicos; actividad de tipo tripsina (T-L), que escinde después de residuos básicos; y la actividad hidrolizante del péptido peptidilglutamilo (PGPH), que escinde después de residuos ácidos. También se han atribuido otras dos actividades menos caracterizadas al proteasoma: actividad BrAAP, que escinde después de aminoácidos de cadena ramificada; y actividad SNAAP, que escinde después de pequeños aminoácidos neutros. Las principales actividades proteolíticas del proteasoma parecen ser aportadas por diferentes sitios catalíticos, ya que los inhibidores, las mutaciones puntuales en las subunidades β y el intercambio de subunidades β inductoras de interferón γ alteran estas actividades en diversos grados.

[0005] La publicación PCT N.º WO2014/152134, que se incorpora en la presente como referencia, describe inhibidores de inmunoproteasomas de tripéptidos epoxi, tales como el Compuesto G, y métodos para su síntesis en pequeña escala. Sin embargo, se necesita una síntesis en gran escala de inhibidores de inmunoproteasomas de tripéptidos epoxi, tales como el Compuesto G, para el desarrollo comercial.

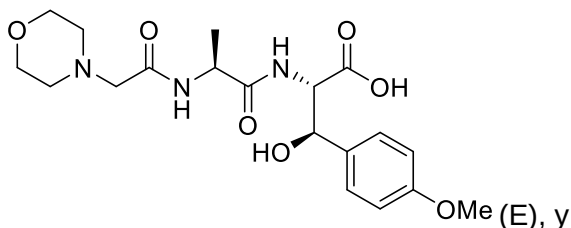
BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0006] En un aspecto, la descripción proporciona un método de preparación (2*S*,3*R*)-*N*-[(2*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-[(2*R*)-2-metiloxiran-2-il]-1-oxopropan-2-il]-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-[(2*S*)-2-[2-(morfolin-4-il)acetamido]propanamido]propanamida (compuesto “G”)

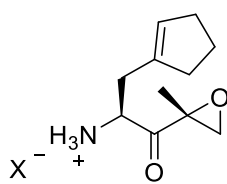


que comprende:

- (a) mezclar una base de amina terciaria y una suspensión de:
- (i) ácido (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((*S*)-2-(2-morfolino-acetamido)propanamido)propanoico (compuesto “E”):



- (ii) sal de (*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((*R*)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto “F”):



(F), donde X^- es un contraión;

en un solvente aprótico para formar una mezcla; y

- (b) mezclar un agente de acoplamiento y la mezcla de la etapa (a) para formar compuesto G;

donde la temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene a -20 °C a 25 °C.

[0007] En algunas formas de realización, X^- se selecciona del grupo que consiste en tosilato, triflato, acetato, naftalensulfonato, 4-nitrobencensulfonato, sulfato, metilsulfato, nitrato, fluoruro, cloruro, bromuro, y sus combinaciones. En algunos casos, donde X^- es tosilato, naftalensulfonato, o 4-nitrobencensulfonato. Por ejemplo, X^- es tosilato.

[0008] En varias formas de realización, el solvente aprótico se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo (“ACN”), diclorometano (“DCM”), tetrahidrofurano (“THF”),

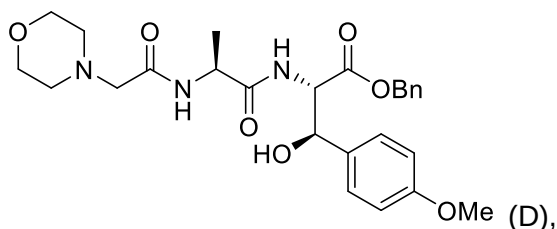
dimetilacetamida ("DMAc"), acetato de etilo ("EtOAc"), acetato de isopropilo ("iPrOAc"), dimetilformamida ("DMF"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico puede ser DCM.

[0009] En algunos casos, la base de amina terciaria se selecciona del grupo que consiste en *N,N*-diisopropiletilamina ("DIPEA"), trietilamina ("TEA"), *N*-metilmorfolina ("NMM"), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina ("TMP"), 2,4,6-trimetilpiridina ("colidina"), y sus combinaciones. Por ejemplo, la base de amina terciaria puede incluir DIPEA. En varios casos, la relación molar de la base de amina terciaria al compuesto E está en el rango de 1:1 a 4:1.

[0010] En algunas formas de realización, el agente de acoplamiento comprende un reactivo de carbodiimida, un reactivo de fosfonio, un reactivo de uronio, un reactivo de imonio, un reactivo de imidazolio, un reactivo organofosforado, un reactivo de cloruro ácido, reactivo de cloroformiato, o un reactivo de piridinio. En varias formas de realización, el reactivo de uronio se selecciona del grupo 3-óxido hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio ("HATU"), hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio ("HBTU"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el reactivo de uronio puede ser HATU. En algunos casos, la relación molar del agente de acoplamiento al compuesto E es 1 a 1. El reactivo de acoplamiento además comprende un aditivo de acoplamiento. En algunas formas de realización, el aditivo de acoplamiento se selecciona del grupo que consiste en un benzotriazol, una dicarboximida, una succinimida, y sus combinaciones. En varias formas de realización, el aditivo de acoplamiento se selecciona del grupo que consiste en *N*-hidroxisuccinimida ("HOSu"), *N*-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida ("HONB"), 1-hidroxibenzotriazol ("HOBt"), 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol ("Cl-HOBt"), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol ("HOAt"), y sus combinaciones.

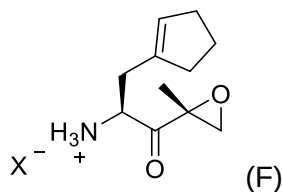
[0011] En varios casos, la temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene a -15 °C a 25 °C. En algunos casos, el mezclado de la etapa (a) comprende agitar la mezcla durante hasta 10 minutos. En varias formas de realización, el mezclado de la etapa (b) comprende agitación durante hasta dos horas. En algunas formas de realización, el compuesto G se lava con uno o más de los siguientes: agua, fosfato monobásico de potasio, bicarbonato de sodio, y sulfato de sodio.

[0012] En varias formas de realización, el compuesto E se prepara mediante la mezcla de un reductor y (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((*S*)-2-(2-morfolinoacetamido)propanamido)propanoato de bencilo (compuesto "D")



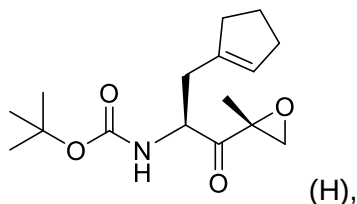
para formar compuesto E. En algunos casos, el reductor se selecciona del grupo que consiste en H_2 , Pd/C; H_2 , Pd(OH)₂/C; Li; Na; 4,4'-di-ter-butilbifenil litio ("Li DTBBP"), y sus combinaciones. En algunas formas de realización, el mezclado del reductor y el compuesto D se produce bajo una atmósfera de nitrógeno. El mezclado del reductor y el compuesto D se puede producir durante hasta 4 horas. Además, el mezclado se puede producir a una temperatura en un rango de 10 °C a 20 °C. En varios casos, la preparación del compuesto E además incluye uno o más de los siguientes: filtración del compuesto E a través de diatomita; lavado del compuesto E; y cristalización del compuesto E con THF y agua.

[0013] Otro aspecto de la descripción proporciona un método de preparación de la sal de (S)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto "F")



que comprende:

- (a) mezclar ácido trifluoroacético ("TFA") y *ter*-butil-((S)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-il)carbamato (compuesto "H"):



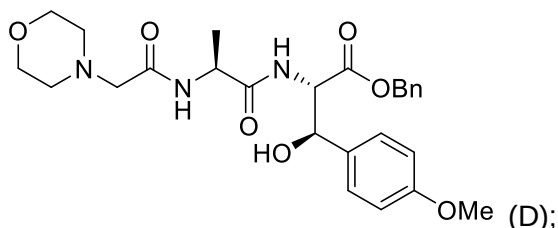
en un solvente aprótico a una temperatura en un rango de -5 °C a 5 °C para formar una mezcla;

- (b) concentrar la mezcla; y
- (c) mezclar un ácido y la mezcla concentrada de la etapa (b) a una temperatura en un rango de -5 °C a 5 °C para formar compuesto F,
- donde X⁻ es una base conjugada del ácido.

[0014] En algunas formas de realización, el ácido se selecciona del grupo que

consiste en ácido *p*-toluensulfónico, ácido trifluorometansulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido naftalensulfónico, ácido 4-nitrobencensulfónico, ácido sulfónico, ácido metilsulfónico, ácido bencensulfónico, ácido nítrico, HF, HCl, HBr, y sus combinaciones. Por ejemplo, el ácido se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido toluensulfónico, ácido naftalensulfónico, ácido 4-nitrobencensulfónico, y sus combinaciones. En algunos casos, la relación molar del ácido al compuesto H es 1 a 1. En varios casos, la relación molar del TFA al compuesto H es 8 a 1. En varias formas de realización, el solvente aprótico en la etapa (a) se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo ("ACN"), diclorometano ("DCM"), tetrahidrofurano ("THF"), dimetilacetamida ("DMAc"), metil ter-butil éter ("MTBE"), isopropil éter ("IPE"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico puede incluir DCM. En algunos casos, la temperatura en la etapa (a), etapa (c), o ambas es 0 °C. En varios casos, la mezcla de la etapa (b) se concentra a una temperatura en un rango de 15 °C a 25 °C. En varias formas de realización, el mezclado de la etapa (a) comprende agitación durante 2 horas. En algunos casos, el mezclado de la etapa (c) comprende agitación durante 10 a 12 horas. En algunas formas de realización, la mezcla concentrada de la etapa (b) también se lava con un solvente aprótico polar a una temperatura en un rango de 15 °C a 25 °C. Los solventes apróticos polares adecuados incluyen dietil éter, tetrahidrofurano ("THF"), acetonitrilo ("ACN"), metil ter-butil éter ("MBTE"), isopropil éter ("IPE") y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico polar puede incluir MBTE. En algunos casos, el método además incluye una o más de las siguientes etapas: filtración del compuesto F, lavado del compuesto F con un solvente aprótico polar, y secado del compuesto F. El solvente aprótico polar para el lavado del compuesto F se puede seleccionar del grupo que consiste en dietil éter, tetrahidrofurano ("THF"), acetonitrilo ("ACN"), metil ter-butil éter ("MBTE"), isopropil éter ("IPE"), y sus combinaciones.

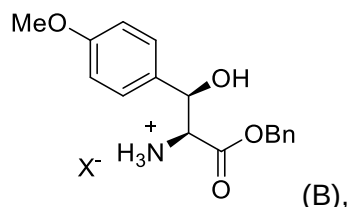
[0015] Aún otro aspecto de la descripción proporciona un método de preparación de (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((*S*)-2-(2-morfolinoacetamido)propanamido)propanoato de bencilo (compuesto "D")



que comprende:

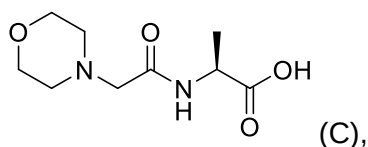
(a) mezclar una base de amina terciaria y una suspensión de:

- (i) sal de (2*S*,3*R*)-1-(benciloxi)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto “B”):



donde X⁻ es un contraión; y

- (ii) (2-morfolinoacetil)-L-alanina (compuesto “C”):



en un solvente aprótico para formar una mezcla; y

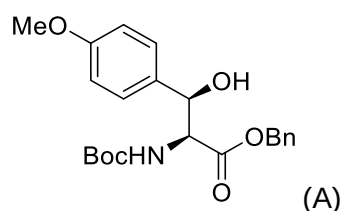
- (b) mezclar un agente de acoplamiento y la mezcla de la etapa (a) para formar compuesto D;

donde la temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene a -5 °C a 5 °C.

[0016] En algunas formas de realización, X⁻ se selecciona del grupo que consiste en tosilato, triflato, acetato, naftalensulfonato, 4-nitrobencensulfonato, sulfato, metilsulfato, nitrato, fluoruro, cloruro, bromuro, y sus combinaciones. Por ejemplo, X⁻ puede ser cloruro. En algunos casos, el solvente aprótico se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo (“ACN”), diclorometano (“DCM”), tetrahidrofurano (“THF”), dimetilacetamida (“DMAc”), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico puede incluir ACN. En varias formas de realización, la base de amina terciaria se selecciona del grupo que consiste en *N,N*-diisopropiletilamina (“DIPEA”), trietilamina (“TEA”), *N*-metilmorfolina (“NMM”), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (“TMP”), 2,4,6-trimetilpiridina (“colidina”), y sus combinaciones. Por ejemplo, la base de amina terciaria puede incluir DIPEA. En varios casos, el agente de acoplamiento comprende un reactivo de carbodiimida, un reactivo de fosfonio, un reactivo de uronio, un reactivo de imonio, un reactivo de imidazolio, un reactivo organofosforado, un reactivo de cloruro ácido, reactivo de cloroformiato, o un reactivo de piridinio. En algunas formas de realización, el reactivo de uronio se selecciona del grupo 3-óxido hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (“HATU”), hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (“HBTU”), y sus combinaciones. Por ejemplo, el reactivo de uronio puede incluir HATU. En algunas formas de realización, la relación molar del agente de acoplamiento al compuesto B es 1 a 1. En varias formas de realización, el reactivo de acoplamiento además incluye un aditivo de acoplamiento. El aditivo de

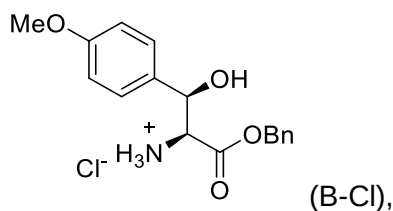
acoplamiento se puede seleccionar del grupo que consiste en un benzotriazol, una dicarboximida, una succinimida, y sus combinaciones. Por ejemplo, el reactivo de acoplamiento se puede seleccionar del grupo que consiste en *N*-hidroxisuccinimida ("HOSu"), *N*-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida ("HONB"), 1-hidroxibenzotriazol ("HOBt"), 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol ("Cl-HOBt"), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol ("HOAt"), y sus combinaciones. En algunos casos, la temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene a -5 °C a 5 °C. En algunas formas de realización, el mezclado de la etapa (b) comprende mezclar porciones del agente de acoplamiento con la mezcla de la etapa (a) durante 30 minutos. En varios casos, el mezclado de la etapa (b) comprende agitar 2 horas. En algunas formas de realización, el método además incluye lavado del compuesto D con uno o más de los siguientes: agua, acetato de isopropilo, fosfato monobásico de potasio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio, y THF.

[0017] El Compuesto B se puede preparar mediante la mezcla de (i) un ácido y (ii) (2*S*,3*R*)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)propanoato de bencilo (compuesto "A"):



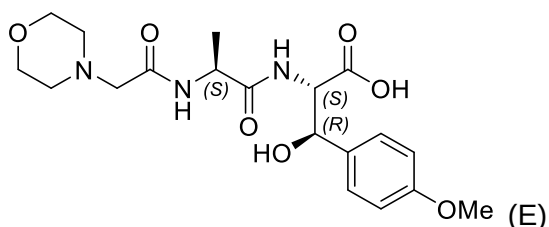
en un solvente aprótico polar, para formar el compuesto B. En algunas formas de realización, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido *p*-toluensulfónico, ácido trifluorometansulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido naftalensulfónico, ácido 4-nitrobencensulfónico, ácido sulfónico, ácido metilsulfónico, ácido nítrico, HF, HCl, HBr, y sus combinaciones. Por ejemplo, el ácido puede incluir ácido trifluoroacético o HCl. En algunas formas de realización, el solvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo, *N*-metilpirrolidona ("NMP"), tetrahidrofurano ("THF"), acetona, dimetilformamida ("DMF"), acetonitrilo ("ACN"), dimetilsulfóxido ("DMSO"), diclorometano ("DCM"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico polar puede incluir acetato de etilo, DCM, o sus combinaciones. En algunos casos, la etapa de mezclado incluye agitar a una temperatura en un rango de 15 °C a 25 °C. El método también puede incluir filtración del compuesto B, secado del compuesto B, o ambos.

[0018] Otro aspecto de la descripción proporciona una forma cristalina de sal cloruro de (2*S*,3*R*)-1-(benciloxi)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto "B-Cl")



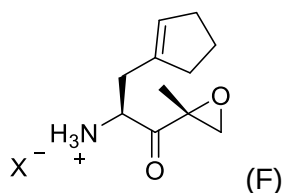
caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos en 4,6, 9,2, 13,8, 18,5, y $32,9 \pm 0,2^\circ 2\theta$ usando radiación Cu K α .

[0019] Aún otro aspecto de la descripción proporciona una forma cristalina de ácido (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((*S*)-2-(2-morfolinoacetamido)propanamido)propanoico (compuesto “E”):



caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos en 6,2, 8,5, 9,7, 12,7, 13,7, 16,0, 16,9 17,2, 18,4, 18,9, 19,2, 19,7, 22,5, 24,7, 25,4, 28,7, y $29,7 \pm 0,2^\circ 2\theta$ usando radiación Cu K α .

[0020] Aún otro aspecto de la descripción proporciona una forma cristalina de sal de (*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((*R*)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto “F”):



donde X⁻ es tosilato, caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos en 6,8, 7,1, 7,4, 14,2, 14,8, 17,0, 17,5, 17,8, 18,5, 18,7, 20,1, 20,3, 23,0, 23,6, 24,5, 29,3, y $31,2 \pm 0,2^\circ 2\theta$ usando radiación Cu K α .

[0021] Otros aspectos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. Aunque los métodos descritos en la presente memoria son susceptibles de formas de realización en diversas formas, la descripción de aquí en adelante incluirá formas de realización específicas con el entendimiento de que la descripción es ilustrativa y no pretende limitar la invención a las formas de realización específicas descritas en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022] La FIG. 1 representa la curva de calorimetría diferencial de barrido

característica ("DSC") para la sal de (2*S*,3*R*)-1-(benciloxi)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto "B").

[0023] La FIG. 2 representa el termograma DSC característico de ácido (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((*S*)-2-(2-morfolino-acetamido)propanamido)propanoico (compuesto "E").

[0024] La FIG. 3 representa los datos del análisis termogravimétrico característico ("TGA") para el compuesto E.

[0025] La FIG. 4 representa el patrón de difracción de rayos X de polvo característico ("XRPD") para el compuesto E.

[0026] La FIG. 5 representa el termograma DSC característico para la sal tosilato de la sal de (*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((*R*)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto "F").

[0027] La FIG. 6 representa el análisis termogravimétrico característico ("TGA") data para la sal tosilato del compuesto F.

[0028] La FIG. 7 representa el termograma DSC característico de la sal del ácido naftalensulfónico del compuesto F.

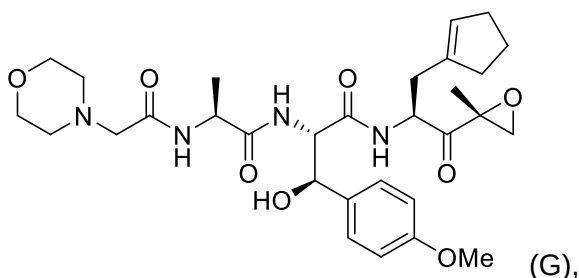
[0029] La FIG. 8 representa los datos del análisis termogravimétrico característico ("TGA") de la sal del ácido naftalensulfónico del compuesto F.

[0030] La FIG. 9 representa el patrón XRPD característico para la sal tosilato del compuesto F.

[0031] La FIG. 10 representa una difracción de rayos X de cristal único ("XRD") de la sal tosilato del compuesto F.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

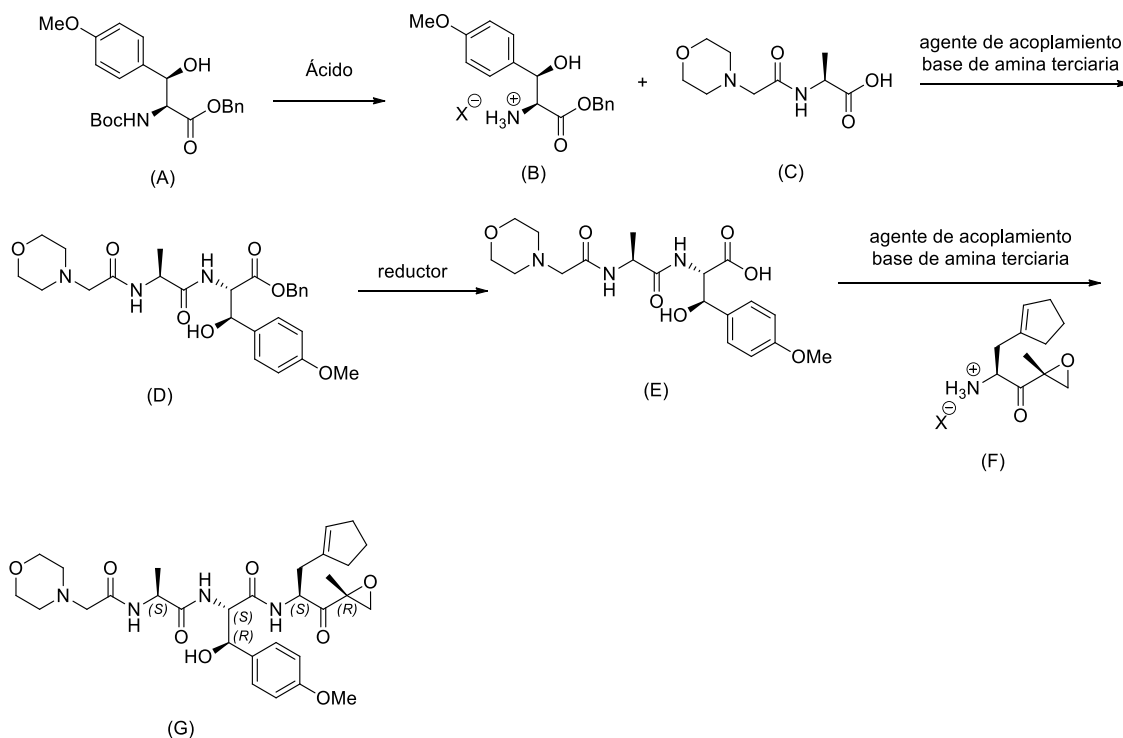
[0032] En la presente se describe un proceso para la preparación de (2*S*,3*R*)-*N*-[(2*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-[(2*R*)-2-metiloxiran-2-il]-1-oxopropan-2-il]-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-[(2*S*)-2-[2-(morfolin-4-il)acetamido]propanamido]propanamida (compuesto "G"):



y sus precursores, y en algunos casos, el proceso es para la preparación en gran escala del compuesto G. El esquema global para la preparación del compuesto G se muestra

a continuación en el Esquema 1.

Esquema 1.



La pureza óptica del compuesto G se controla durante la síntesis por la calidad de los materiales de partida y los reactivos específicos utilizados para las transformaciones.

[0033] Los compuestos descritos en la presente se pueden identificar por su estructura química y/o por su nombre químico. Cuando la estructura química y el nombre químico entran en conflicto, la estructura química es determinante de la identidad del compuesto.

[0034] A menos que se indique de otro modo, los términos y abreviaturas usados en esta memoria descriptiva incluyen el significado normal y habitual para aquellos del oficio de nivel medio.

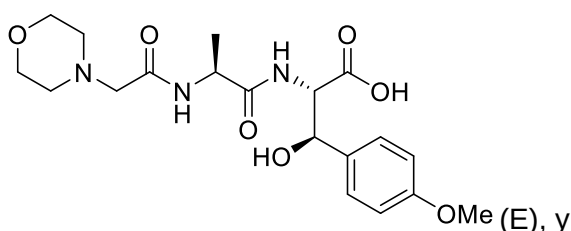
[0035] Como la contribución de la presente descripción no se limita a formas de realización o aspectos particulares descritos en la presente, la descripción proporciona a un experto en la técnica formas de realización adicionales que incluyen cambios y modificaciones para adaptarse a diversos usos y condiciones. Por ejemplo, los cambios y modificaciones de materiales, métodos de síntesis o procedimientos descritos en la presente serán evidentes para una persona del oficio de nivel medio.

[0036] Cuando se usan rangos en la presente para las propiedades físicas, tales como peso molecular, o propiedades químicas, tales como fórmulas químicas, se

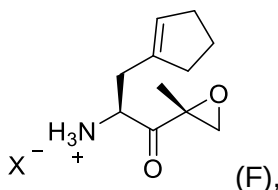
considera que incluyen todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos y formas de realización específicas.

Preparación del Compuesto G

[0037] En un aspecto, en la presente se proporciona un método para preparar el compuesto G. El Compuesto G se puede preparar en dos etapas—etapa (a) y etapa (b). En la etapa (a), una mezcla se forma mediante la mezcla entre sí de una base de amina terciaria y una suspensión que incluye: (i) ácido (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((*S*)-2-(2-morfolino-acetamido)propanamido)propanoico (compuesto “E”):



(ii) sal de (*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((*R*)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto “F”):



donde X^- es un contraión, en un solvente aprótico para formar una mezcla. En la etapa (b), la mezcla de la etapa (a) y un agente de acoplamiento se mezclan entre sí a una temperatura en un rango de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 25 °C para formar compuesto G.

[0038] El contraión (X^-) puede ser cualquier anión capaz de formar un enlace iónico con el grupo amonio del compuesto F. En algunas formas de realización, X^- se selecciona del grupo que consiste en tosilato, triflato, acetato, naftalensulfonato, 4-nitrobencensulfonato, sulfato, metilsulfato, nitrato, fluoruro, cloruro, bromuro, y sus combinaciones. En algunos casos, X^- puede ser tosilato, naftalensulfonato, o 4-nitrobencensulfonato. Por ejemplo, X^- puede ser tosilato.

[0039] El solvente aprótico puede ser cualquier solvente aprótico (o mezcla de solventes) en el que puede proceder la reacción de sustitución de acilo nucleofílico entre los compuestos E y F. Los solventes apróticos adecuados incluyen acetonitrilo (“ACN”), diclorometano (“DCM”), tetrahidrofurano (“THF”), dimetilacetamida (“DMAc”), acetato de etilo (“EtOAc”), acetato de isopropilo (“iPrOAc”), dimetilformamida (“DMF”), y sus combinaciones. En varias formas de realización, el solvente aprótico se selecciona del

grupo que consiste en ACN, THF, DMF, y DCM. Por ejemplo, el solvente aprótico puede incluir DCM.

[0040] El Compuesto E y el compuesto F pueden estar presentes en una relación molar de aproximadamente 0,8:1 a 1,3:1. En algunas formas de realización, los compuestos E y F están presentes en una relación de aproximadamente 0,9:1 a 1,1:1. Por ejemplo, la relación molar de los compuestos E y F puede ser aproximadamente 1:1, o en un rango de 1:1,11 a 1:1,15.

[0041] La base de amina terciaria puede ser cualquier base de amina terciaria que puede promover o catalizar la reacción de sustitución de acilo nucleofílico entre los compuestos E y F. Las bases de amina terciaria adecuadas pueden incluir, por ejemplo, *N,N*-diisopropiletilamina ("DIPEA"), trietilamina ("TEA"), *N*-metilmorfolina ("NMM"), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina ("TMP"), 2,4,6-trimetilpiridina ("colidina"), y sus combinaciones. Por ejemplo, la base de amina terciaria puede incluir DIPEA. La base de amina terciaria puede estar presente en una relación molar al compuesto E en un rango de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1. En algunas formas de realización, la base de amina terciaria y el Compuesto E están presentes en una relación de aproximadamente 2,5:1 a 4:1 o 2,5:1 a 3,5:1. Por ejemplo, la relación de base de amina terciaria al compuesto E puede ser aproximadamente 3,5:1 o 3,9:1.

[0042] El agente de acoplamiento puede incluir, por ejemplo, un reactivo de carbodiimida, un reactivo de fosfonio, a reactivo de uronio, un reactivo de imonio, un reactivo de imidazolio, un reactivo organofosforado, un reactivo de cloruro ácido, reactivo de cloroformiato, un reactivo de piridinio, o sus combinaciones. Véase, *por ejemplo*, Han & Kim, *Tetrahedron Report* 60:2447-2467 (2004); Montalbetti y Falque, *Tetrahedron* 61:10827-10852 (2005). La carbodiimida puede incluir, por ejemplo, *N,N'*-diciclohexilcarbodimida ("DCC"), 1,3-diisopropilcarbodiimida ("DIC"), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ("EDC"), y/o isopropilcarbodimida ("CIC"), y sus combinaciones. El agente fosfonio puede incluir, por ejemplo, hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio ("BOP") o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonio ("PyBOP"), y sus combinaciones. El agente uronio puede incluir, por ejemplo, 3-óxido hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio ("HATU"), hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio ("HBTU"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el agente uronio puede incluir HATU. El agente imidazolio puede incluir, por ejemplo, 1,1'-carbonildiimidazol ("CDI"). El agente cloruro ácido incluye, por ejemplo, cloruro de pivaloílo, cloruro de 2, 4, 6-trimetilbenzoílo y sus combinaciones. El agente

cloroformiato puede incluir, por ejemplo, cloroformiato de etilo, cloroformiato de isobutilo, y sus combinaciones. El agente de acoplamiento puede estar presente en una relación molar al compuesto en un rango de aproximadamente 0,8:1 a aproximadamente 1:5. En algunas formas de realización, el agente de acoplamiento y el Compuesto E están presentes en una relación de aproximadamente 0,9:1 a 1,1:1. Por ejemplo, la relación del agente de acoplamiento al compuesto E puede ser aproximadamente 1:1 o 1,11:1.

[0043] La reacción de acoplamiento se puede realizar en presencia de un aditivo de acoplamiento. Los aditivos de acoplamiento son conocidos en la técnica y se puede usar cualquier aditivo adecuado para la formación del compuesto G. Los aditivos de acoplamiento adecuados incluyen, por ejemplo, benzotriazoles, dicarboximidas, y succinimidas. En algunas formas de realización, el aditivo de acoplamiento se selecciona del grupo que consiste en *N*-hidroxisuccinimida ("HOSu"), *N*-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida ("HONB"), 1-hidroxibenzotriazol ("HOBt"), 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol ("Cl-HOBt"), 1-hidroxí-7-azabenzotriazol ("HOAt"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el aditivo de acoplamiento puede incluir HOBt.

[0044] La temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene en un rango de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 25 °C. En algunas formas de realización, la temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene en un rango de aproximadamente -15 °C a aproximadamente 25 °C. En algunos casos, la temperatura de cada etapa de mezclado se mantiene en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 15 °C. Por ejemplo, la temperatura de cada etapa de mezclado se puede mantener en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C. La temperatura de cada etapa de mezclado puede ser igual o diferente.

[0045] En la etapa (a) de la preparación del compuesto G, el mezclado se puede producir durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, hasta aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 minutos). En algunas formas de realización, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante hasta aproximadamente 10 minutos. En algunos casos, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante al menos aproximadamente 30 segundos o al menos aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 minutos). Por ejemplo, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 30 minutos, o durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos, o durante aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 15 minutos, o durante aproximadamente 5 minutos a

aproximadamente 10 minutos.

[0046] En la etapa (b) de la preparación del compuesto G, el mezclado se puede producir durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 3 horas (por ejemplo, hasta aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 horas). En algunas formas de realización, el mezclado de la etapa (b) se puede producir durante hasta aproximadamente 2 horas. En algunos casos, el mezclado de la etapa (b) se puede producir durante al menos aproximadamente 30 minutos, o al menos aproximadamente 1 hora, o al menos aproximadamente 1,5 horas. Por ejemplo, el mezclado de la etapa (b) se puede producir durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas, o durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2,5 horas, o durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas.

[0047] En la etapa (b), la reacción de acoplamiento se puede producir bajo una atmósfera de nitrógeno. En algunos casos, la reacción de acoplamiento no se produce bajo una atmósfera de nitrógeno.

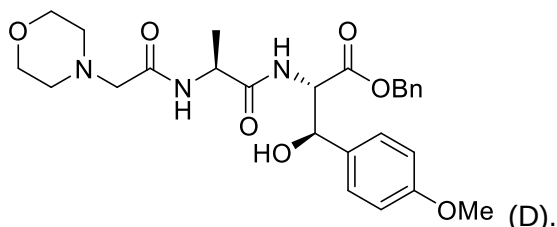
[0048] Después de la etapa (b), el compuesto G se puede lavar con uno o más solventes. La temperatura durante el lavado opcionalmente puede estar en un rango de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C, o aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. Los solventes adecuados para el lavado incluyen, por ejemplo, agua, fosfato monobásico de potasio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio, y sus combinaciones. En algunas formas de realización, se añade agua al compuesto G después de la etapa (b), y la mezcla bifásica resultante se separa en una capa acuosa y una capa orgánica antes del lavado. En varios casos, el compuesto G se puede lavar con agua, fosfato monobásico de potasio, bicarbonato de sodio, y sulfato de sodio.

[0049] Por ejemplo, el compuesto G se puede preparar mediante (a) la mezcla entre sí del compuesto E y el compuesto F (relación molar 1:1) en DCM durante un período de hasta aproximadamente 10 minutos para formar una mezcla, y (b) mezclar la mezcla de la etapa (a) y aproximadamente 1 equivalente molar de HATU durante hasta aproximadamente dos horas bajo una atmósfera de nitrógeno, donde la temperatura de cada etapa está en el rango de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 25 °C, o aproximadamente -20 °C a 0 °C. La mezcla resultante se puede inactivar con agua para producir una mezcla bifásica. La capa orgánica se puede separar, lavar con agua, luego con fosfato monobásico de potasio, seguido por bicarbonato de sodio y sulfato de sodio (secuencialmente).

Preparación del Compuesto E

[0050] El Compuesto E se puede preparar mediante la mezcla de un reductor y

(2S,3R)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)propanamido)propanoato de bencilo (compuesto "D")



[0051] El reductor puede ser cualquier agente adecuado capaz de eliminar el grupo bencilo del compuesto D para formar el ácido carboxílico del compuesto E. Los reductores adecuados incluyen, por ejemplo, H₂ en presencia de Pd/C o Pd (OH)₂/C; Li; Na; 4,4'-di-ter-butilbifenil litio ("Li DTBBP"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el reductor puede ser H₂, en presencia de Pd/C.

[0052] La mezcla del reductor y del compuesto D se produce en cualquier solvente capaz de permitir que se produzca la reacción de reducción. Por ejemplo, el solvente puede incluir THF, metanol, o una combinación de estos.

[0053] En algunas formas de realización, el compuesto D se proporciona bajo una atmósfera de nitrógeno antes de la exposición a una atmósfera de hidrógeno. En varias formas de realización, la atmósfera de hidrógeno se establece a aproximadamente 15 psi.

[0054] La mezcla del reductor y el Compuesto D se puede producir durante un período de al menos 30 minutos y hasta aproximadamente 5 horas (por ejemplo, hasta aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, o 4,5 horas). En algunas formas de realización, el mezclado se puede producir durante hasta aproximadamente 4 horas. En algunos casos, el mezclado del reductor y el Compuesto D se puede producir durante al menos aproximadamente 30 minutos, o al menos aproximadamente 1 hora (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5, o 2, o 2,5, o 3, o 3,5 horas). Por ejemplo, el mezclado se puede producir durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 5 horas, o aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, o aproximadamente 2 hora a aproximadamente 4 horas.

[0055] La temperatura de la mezcla se mantiene en un rango de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C. En algunas formas de realización, la temperatura se mantiene a aproximadamente 17 °C.

[0056] En algunos casos, después de completar la mezcla, el compuesto E se filtra, tal como a través de tierra de diatomeas (es decir, diatomita). El filtrado resultante se puede lavar posteriormente con un solvente adecuado (por ejemplo, agua, metanol,

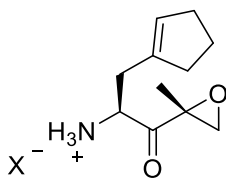
agua y sus combinaciones).

[0057] El Compuesto E (con o sin lavado) se puede cristalizar para formar un polimorfo, caracterizado por el termograma de calorimetría diferencial de barrido (“DSC”), datos del análisis termogravimétrico (“TGA”), y patrón de difracción de rayos X de polvo (“XRPD”) representado en las Figuras 2, 3, y 4, respectivamente. Por ejemplo, la cristalización del compuesto E se puede producir en THF y agua mediante el calentamiento del compuesto E a una temperatura en un rango de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, o aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, o aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C, y luego enfriamiento a la temperatura a aproximadamente 0 °C. En consecuencia, otro aspecto de la presente descripción es una forma cristalina del compuesto E, que se caracteriza por un patrón XRPD que comprende picos en 6,2, 8,5, 9,7, 12,7, 13,7, 16,0, 16,9 17,2, 18,4, 18,9, 19,2, 19,7, 22,5, 24,7, 25,4, 28,7, y $29,7 \pm 0,2^\circ 2\theta$ usando radiación Cu K α , como se muestra en la Figura 4.

[0058] Por ejemplo, el compuesto E se puede preparar mediante la mezcla entre sí de un reductor, tal como H₂, en presencia de Pd/C, y el Compuesto D bajo una atmósfera de nitrógeno, a 10 °C a 20 °C, durante un período de al menos 30 minutos hasta 4 horas. El Compuesto E se puede filtrar a través de diatomita, y la torta de filtración resultante se puede lavar (por ejemplo, con agua, metanol, y/o THF). El Compuesto E se puede cristalizar mediante el calentamiento a aproximadamente 60 °C a 70 °C, ajuste de la temperatura a aproximadamente 55 °C a 65 °C y adición de THF a la mezcla, calentamiento de la mezcla nuevamente a 60 °C a 70 °C, adición de agua a la mezcla calentada, enfriamiento de la mezcla de nuevo a 55 °C a 65 °C, adición de un cristal semilla a la mezcla, y agitación de la mezcla sembrada durante aproximadamente dos horas a 0 °C. La filtración, lavado, y secado de la mezcla enfriada produce el compuesto E cristalizado.

Preparación del Compuesto F

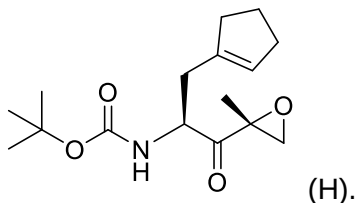
[0059] En otro aspecto, en la presente se proporciona un método de preparación del compuesto F.



(F), donde X⁻ es un contraión.

[0060] El Compuesto F se puede preparar en tres etapas—etapas (a), (b), y (c). En la etapa (a), una mezcla se forma mediante la mezcla entre sí de un solvente aprótico,

ácido trifluoroacético ("TFA"), y *ter*-butil-((*S*)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((*R*)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-il)carbamato (compuesto H):



a una temperatura en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C. En la etapa (b), la mezcla de la etapa (a) se concentra. En la etapa (c), la mezcla concentrada de la etapa (b) se mezcla entre sí con un ácido a una temperatura en un rango de aproximadamente -5 °C a 5 °C para formar el compuesto F.

[0061] El ácido puede ser cualquier ácido capaz de formar una sal con el grupo aminio del compuesto F. Los ácidos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido *p*-toluensulfónico, ácido trifluorometansulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido naftalensulfónico, ácido 4-nitrobencensulfónico, ácido sulfónico, ácido metilsulfónico, ácido bencensulfónico, ácido nítrico, HF, HCl, HBr, y sus combinaciones. En algunas formas de realización, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido *p*-toluensulfónico, ácido naftalensulfónico, ácido 4-nitrobencensulfónico, y sus combinaciones. Por ejemplo, el ácido puede incluir ácido *p*-toluensulfónico.

[0062] El solvente aprótico en la etapa (a) puede ser cualquier solvente aprótico (o mezcla de solventes) en que puede proceder la reacción. Los solventes apróticos adecuados pueden incluir acetonitrilo ("ACN"), diclorometano ("DCM"), tetrahidrofurano ("THF"), dimetilacetamida ("DMAc"), metil *ter*-butil éter ("MTBE"), isopropil éter ("IPE"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico puede incluir DCM.

[0063] El ácido trifluoroacético en la etapa (a) puede estar presente en una relación molar al compuesto H en un rango de aproximadamente 15:1 a 5:1. En algunas formas de realización, el ácido trifluoroacético y el Compuesto H están presentes en una relación de aproximadamente 10:1 a 7,5:1. Por ejemplo, la relación molar del ácido trifluoroacético y el Compuesto H puede ser aproximadamente 8:1.

[0064] En algunas formas de realización, la reacción de desprotección de la etapa (a) se produce bajo una atmósfera de nitrógeno.

[0065] La temperatura de la mezcla en la etapa (a), etapa (c), o la etapa (a) y etapa (c) se mantiene en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C, o a aproximadamente 0 °C. En algunas formas de realización, la mezcla se concentra en la etapa (b) a una temperatura en un rango de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C.

[0066] En algunos casos, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante un período de al menos 30 minutos hasta aproximadamente 3 horas (por ejemplo, hasta aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 horas). En algunas formas de realización, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 2 horas. En algunos casos, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante al menos aproximadamente 30 minutos, o al menos aproximadamente 1 hora, o al menos aproximadamente 1,5 horas. Por ejemplo, el mezclado de la etapa (a) se puede producir durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2,5 horas, o aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas.

[0067] En varios casos, la mezcla de la etapa (c) se puede producir durante un período de al menos 5 horas hasta aproximadamente 12 horas (por ejemplo, hasta aproximadamente 7, 8, 9, 10 u 11 horas). En algunas formas de realización, la mezcla de la etapa (c) se puede producir durante un período de hasta aproximadamente 10 a 12 horas. En algunos casos, el mezclado de la etapa (c) se puede producir durante al menos aproximadamente 5 horas (por ejemplo, al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, o 10 horas). Por ejemplo, la mezcla de la etapa (c) se puede producir durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 10 horas a aproximadamente 12 horas.

[0068] En algunos casos, la mezcla concentrada de la etapa (b) se puede enjuagar con un solvente aprótico polar. Los solventes apróticos polares adecuados incluyen, por ejemplo, dietil éter, tetrahidrofurano ("THF"), acetonitrilo ("ACN"), metil ter-butil éter ("MBTE"), isopropil éter ("IPE") y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico polar puede ser MBTE.

[0069] Después de la etapa (c), el compuesto F opcionalmente se puede filtrar a una temperatura en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C, se lava con uno o más solventes apróticos polares (por ejemplo, dietil éter, tetrahidrofurano ("THF"), acetonitrilo ("ACN"), metil ter-butil éter ("MBTE"), isopropil éter ("IPE"), y sus combinaciones), y/o se seca.

[0070] El Compuesto F se puede cristalizar para formar un polimorfo, caracterizado por el termograma de calorimetría diferencial de barrido ("DSC"), datos del análisis termogravimétrico ("TGA"), y patrón de difracción de rayos X de polvo ("XRPD") representado en las Figuras 5, 6, 7, 8, y 9. En consecuencia, otro aspecto de la presente descripción es una forma cristalina del compuesto F, tal como la sal tosilato del compuesto F, que se caracteriza por un patrón XRPD que comprende picos en 6,8, 7,1,

7,4, 14,2, 14,8, 17,0, 17,5, 17,8, 18,5, 18,7, 20,1, 20,3, 23,0, 23,6, 24,5, 29,3, y $31,2 \pm 0,2^\circ 2\theta$ usando radiación Cu K α , como se muestra en la Figura 9.

[0071] La forma de tosilato del compuesto F también se puede caracterizar por una estructura de difracción de rayos X de cristal único ("XRD"), como se describe en la sección de Ejemplos a continuación. El cristal, como se representa en la Figura 10, tiene una dimensión de celda unitaria de $a = 13,264 (3) \text{ \AA}$, $a = 90^\circ$, $b = 5,6920 (11) \text{ \AA}$, $b = 109,410 (4)^\circ$, $c = 13,416 (3) \text{ \AA}$, $g = 90^\circ$ y pertenece al grupo espacial P21. El parámetro Flack es 0,03 (0,08 su). Las cristalizaciones que utilizaron otros ácidos tales como ácido 2-naftalensulfónico, metansulfónico, bencensulfónico, fosfórico y sulfúrico no proporcionaron cristales de calidad de rayos X en los siguientes solventes: tolueno, dietil éter, MTBE, 1,4-dioxano, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, butanol, isopropanol, y hexano/acetato de etilo (relación 1:1).

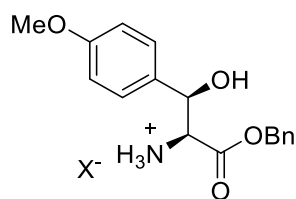
[0072] Por ejemplo, el compuesto F se puede preparar al (a) mezclar entre sí un solvente aprótico (por ejemplo, DCM), TFA, y el Compuesto H en una relación molar de 8:1 y una temperatura de aproximadamente 0°C , bajo una atmósfera de nitrógeno, durante un período de tiempo de hasta 2 horas, (b) concentración de la mezcla a una temperatura de aproximadamente 15°C a 25°C , y (c) mezclar la mezcla concentrada y un ácido (por ejemplo, ácido *p*-toluensulfónico) a temperatura de aproximadamente 0°C durante un período de tiempo de 10 a 12 horas. El compuesto F resultante se puede filtrar a aproximadamente 0°C , lavar con un solvente aprótico polar (por ejemplo, MBTE), y secar bajo vacío.

Preparación del Compuesto D

[0073] En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para preparar el compuesto D.

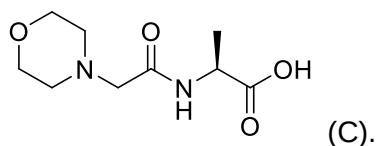
[0074] El Compuesto D se puede preparar en dos etapas—etapa (a) y etapa (b). En la etapa (a), una mezcla se prepara mediante la mezcla entre sí una base de amina terciaria y una suspensión de compuesto B y el Compuesto C en un solvente aprótico:

(i) sal de (2*S*,3*R*)-1-(benciloxi)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto "B"):



(B), donde X⁻ es un contraión, y

(ii) (2-morfolinoacetil)-L-alanina (compuesto "C"):



En la etapa (b), la mezcla de la etapa (a) y un agente de acoplamiento se mezclan entre sí a una temperatura en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C para formar compuesto D.

[0075] El contraión (X^-) puede ser cualquier anión capaz de formar un enlace iónico con el grupo amonio del compuesto B. En algunas formas de realización, X^- se selecciona del grupo que consiste en tosilato, triflato, acetato, naftalensulfonato, 4-nitrobencensulfonato, sulfato, metilsulfato, nitrato, fluoruro, cloruro, bromuro, y sus combinaciones. En algunos casos, X^- puede ser tosilato, naftalensulfonato, o 4-nitrobencensulfonato. Por ejemplo, X^- puede cloruro.

[0076] El solvente aprótico puede ser cualquier solvente aprótico (o mezcla de solventes) en el que procede la reacción de sustitución de acilo nucleofílico entre los compuestos B y C. Los solventes apróticos adecuados pueden incluir acetonitrilo ("ACN"), diclorometano ("DCM"), tetrahidrofurano ("THF"), dimetilacetamida ("DMAc"), acetato de etilo ("EtOAc"), acetato de isopropilo ("iPrOAc"), dimetilformamida ("DMF"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente aprótico puede incluir ACN.

[0077] El Compuesto B y el Compuesto C pueden estar presentes en una relación molar de aproximadamente 0,65:1 a 1,1:1. En algunas formas de realización, los compuestos B y C están presentes en una relación de aproximadamente 0,75:1 a 1:1. Por ejemplo, la relación molar de los compuestos B y C puede ser aproximadamente 0,8:1.

[0078] La base de amina terciaria puede ser cualquier base de amina terciaria que puede promover o catalizar la reacción de sustitución de acilo nucleofílico entre los compuestos B y C. Las bases de amina terciaria adecuadas pueden incluir, por ejemplo, *N,N*-diisopropiletilamina ("DIPEA"), trietilamina ("TEA"), *N*-metilmorfolina ("NMM"), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina ("TMP"), 2,4,6-trimetilpiridina ("colidina"), o sus combinaciones. Por ejemplo, la base de amina terciaria puede incluir DIPEA. La base de amina terciaria puede estar presente en una relación molar al compuesto B en un rango de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3,5:1. Por ejemplo, la relación molar de la base de amina terciaria al compuesto B puede ser aproximadamente 3,5:1.

[0079] El agente de acoplamiento puede incluir, por ejemplo, un reactivo de carbodiimida, un reactivo de fosfonio, a reactivo de uronio, un reactivo de imonio, un reactivo de imidazolio, un reactivo organofosforado, un reactivo de cloruro ácido,

reactivo de cloroformiato, un reactivo de piridinio, o sus combinaciones, como se describió previamente para la preparación del compuesto G. Los ejemplos del reactivo carbodiimida, reactivo de fosfonio, reactivo de uronio, reactivo de imonio, reactivo de imidazolio, reactivo organofosforado, reactivo de cloruro ácido, reactivo de cloroformiato o reactivo de piridinio se describen anteriormente para la preparación del compuesto G. En algunas formas de realización, el agente uronio puede incluir HATU, HBTU, y sus combinaciones. Por ejemplo, el agente uronio puede ser HATU. El agente de acoplamiento puede estar presente en una relación molar al compuesto B en un rango de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3. En algunas formas de realización, el agente de acoplamiento y el Compuesto B están presentes en una relación de aproximadamente 1:1 a 1:2. Por ejemplo, la relación del agente de acoplamiento al compuesto B puede ser aproximadamente 1:1,5.

[0080] La reacción de acoplamiento se puede realizar en presencia de un aditivo de acoplamiento. Los ejemplos de cantidades de aditivos de acoplamiento de estos se describen para la preparación del compuesto G.

[0081] La temperatura de cada etapa de mezcla se mantiene en un rango de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C. En algunas formas de realización, la temperatura de cada etapa de mezcla se mantiene a aproximadamente 0 °C. La temperatura de cada etapa de mezcla puede ser igual o diferente.

[0082] En la etapa (b) de la preparación del compuesto D, la mezcla puede incluir porciones de mezcla del agente de acoplamiento con la mezcla de la etapa (a) durante un período de al menos 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, hasta aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 minutos). En algunas formas de realización, las porciones del agente de acoplamiento se pueden añadir a la mezcla de la etapa (a) durante un período de al menos aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 minutos). Por ejemplo, las porciones del agente de acoplamiento se pueden añadir a la mezcla de la etapa (a) durante un período de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, o aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos. La mezcla de la etapa (b) también puede incluir agitar la mezcla durante hasta aproximadamente 3 horas (por ejemplo, hasta aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 horas). En algunas formas de realización, la agitación se puede producir durante hasta aproximadamente 2 horas. En algunos casos, la agitación se puede producir durante al menos aproximadamente

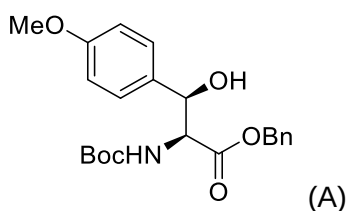
30 minutos, o al menos aproximadamente 1 hora, o al menos aproximadamente 1,5 horas. Por ejemplo, la agitación se puede producir durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2,5 horas, o aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas.

[0083] Después de la etapa (b), el compuesto D se puede inactivar y/o lavar con uno o más solventes a una temperatura en un rango de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. Los solventes adecuados para la inactivación y/o lavado incluyen, por ejemplo, agua, acetato de isopropilo, fosfato monobásico de potasio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio, THF, y sus combinaciones.

[0084] Por ejemplo, el compuesto D se puede preparar al (a) mezclar entre sí el compuesto B y el Compuesto (C) (relación molar 1:1) y una base de amina terciaria (por ejemplo, DIPEA) en ACN, y (b) mezclar la mezcla de la etapa (a) y aproximadamente 1 equivalente molar de HATU en porciones durante un período de aproximadamente 30 minutos, y luego agitar la mezcla durante un período de hasta aproximadamente 2 horas, donde la temperatura de cada etapa es aproximadamente 0 °C. La mezcla resultante de la etapa (b) se puede inactivar con, por ejemplo, bicarbonato de sodio para formar una mezcla bifásica. La fase orgánica se puede separar y lavar con bicarbonato de sodio, fosfato monobásico de potasio, y/o sulfato de sodio.

Preparación del Compuesto B

[0085] El Compuesto B se puede preparar mediante la mezcla de (i) un ácido y (ii) (2*S*,3*R*)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)propanoato de bencilo (compuesto "A"):



en un solvente aprótico.

[0086] El ácido puede ser cualquier ácido adecuado capaz de desproteger el grupo amino en el compuesto A. Los ácidos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido *p*-toluensulfónico, ácido trifluorometansulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido naftalensulfónico, ácido 4-nitrobencensulfónico, ácido sulfónico, ácido metilsulfónico, ácido nítrico, HF, HCl, HBr, y sus combinaciones. En algunas formas de realización, el ácido incluye ácido trifluoroacético o HCl.

[0087] El solvente aprótico puede ser cualquier solvente en el que se puede producir la reacción de desprotección. Los solventes adecuados incluyen acetato de etilo, N-

metilpirrolidona ("NMP"), tetrahidrofurano ("THF"), acetona, dimetilformamida ("DMF"), acetonitrilo ("ACN"), dimetilsulfóxido ("DMSO"), diclorometano ("DCM"), y sus combinaciones. Por ejemplo, el solvente puede incluir acetato de etilo, DCM, o una combinación de estos.

[0088] En algunas formas de realización, la temperatura de la mezcla durante la etapa de mezclado se mantiene en un rango de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, o a aproximadamente 20 °C.

[0089] En algunos casos, después de completar el mezclado, el compuesto B se filtra y se seca bajo vacío para formar un polimorfo cristalino, que se caracteriza por el termograma DSC representado en la Figura 1. Por lo tanto, otro aspecto de la presente descripción es una forma cristalina del compuesto B, que se caracteriza por un patrón de XRPD que comprende picos a 4,6, 9,2, 13,8, 18,5 y $32,9 \pm 0,2^\circ 2\theta$ usando radiación Cu K α .

[0090] Por ejemplo, el compuesto B se puede preparar mediante la mezcla entre sí de un ácido (por ejemplo, HCl) y el Compuesto A a 20 °C, filtración y secado del compuesto B resultante.

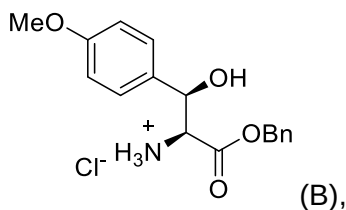
EJEMPLOS

[0091] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración y no se considera que limitan el alcance de la invención.

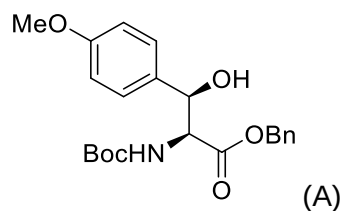
Esquema de síntesis general

[0092] El Compuesto G se puede preparar de acuerdo con el Esquema 1, mostrado anteriormente.

Ejemplo 1: Preparación en gran escala de la sal HCl de la sal de (2S,3R)-1-(benciloxi)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-aminio (Compuesto "B"):



[0093] El acetato de etilo (58,5 kg) a 20 °C se cargó con gas HCl (6,8 kg). A esta solución se disolvió (2S,3R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)propanoato de bencilo (compuesto "A"):

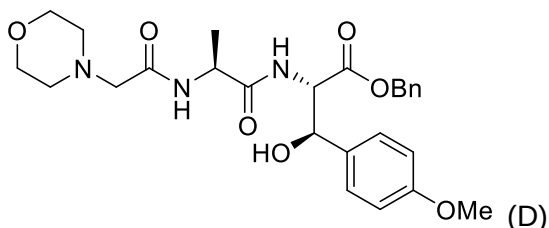


(5 kg, 12,5 mol, predisoluto en 32,5 por acetato de etilo). La suspensión se agitó a 20 °C y después de completar, según se determina por HPLC, se filtró y se secó bajo vacío a 45 °C para proporcionar un polimorfo cristalino del compuesto B (3,85 kg) como la sal HCl. LC/MS (LRMS(MH) m/z: 302). Pureza HPLC 97,9 %. La curva de DSC característica se muestra en la Figura 1.

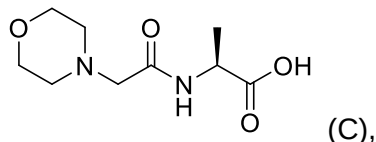
Ejemplo 2: Síntesis a pequeña escala de la sal TFA de la sal de (2S,3R)-1-(benciloxi)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-aminio (Compuesto "B"):

[0094] Ácido trifluoroacético ("TFA") (20 ml) se añadió a una solución de compuesto A (7,0 g, 17,4 mmol) en diclorometano ("DCM") (50 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 30 min luego se diluyó con DCM (100 ml). Se añadió solución saturada de NaHCO₃ (acuosa, 100 ml) y las dos capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 100 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron en sulfato de sodio anhidro luego se concentraron para proporcionar el compuesto B bruto (5,0 g, 84 % de rendimiento) como la sal TFA. LC/MS (LRMS(MH) m/z: 302).

Ejemplo 3: Preparación en gran escala del (2S,3R)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)propanamido)propanoato (Compuesto "D")



[0095] Al compuesto B (3,8 kg) y (2-morfolinoacetil)-L-alanina (compuesto "C"):



(2,5 kg) a 20 °C se añadió acetonitrilo (30,4 kg). La temperatura se ajustó a 0 °C y se añadió *N,N*-diisopropiletilamina ("DIPEA") (3,19 kg), seguido por 3-óxido hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio ("HATU") (5,22 kg) en porciones durante 30 min. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 0 °C luego se inactivó con NaHCO₃ 3,5 % (acuoso, 46 kg) y se agitó durante 30 min. Después de decantar durante 1 h a 20 °C, se añadió NaHCO₃ sólido y la mezcla

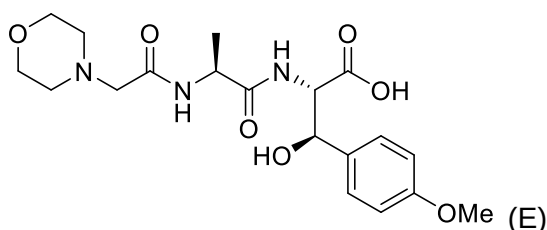
se agitó durante 30 min luego se dejó decantar de nuevo a 20 °C durante 1 h. La capa acuosa se diluyó con agua (30,6 kg), se extrajo con acetato de isopropilo ("iPrOAc") (23,4 kg), y las capas orgánicas se combinaron. Las capas orgánicas se extrajeron con iPrOAc (3 x 27 kg), se lavaron con NaHCO₃ 3,5 % (acuoso, 30 kg), KH₂PO₄ (acuoso, 3 x 65 kg), agua (15 kg), NaHCO₃ 7 % (acuoso, 2 x 61 kg), y Na₂SO₄ 5 % (acuoso, 3 x 55 kg). La solución se concentró a 18 L luego se extrajo con tetrahidrofurano ("THF") (4 x 22,8 L) para proporcionar el producto (5,04 kg, 90 % de rendimiento, 97,9 % de pureza por HPLC) como una solución en THF (34,5 % en peso, 14,6 kg total).

[0096] Se obtuvieron resultados similares al usar 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCl ("EDC") (1,1 equiv.) en lugar de HATU como reactivo de acoplamiento.

Ejemplo 4: Síntesis a pequeña escala del Compuesto D

[0097] Los reactivos HATU (6,79 g, 17,9 mmol) y DIPEA (9,63 ml, 59,2 mmol) se añadieron a una solución de compuesto B (sal TFA, 5,0 g, 14,8 mmol) y el Compuesto C (3,36 g, 15,9 mmol) en dimetilformamida ("DMF") (100 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna flash sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1 a 1:2) para proporcionar el compuesto D (5,8 g, 78 % de rendimiento) como un sólido incoloro. LC/MS (LRMS(MH) m/z: 500.

Ejemplo 5: Preparación en gran escala del ácido (2S,3R)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((S)-2-(2-morfolino-acetamido)propanamido)propanoico (compuesto "E"):



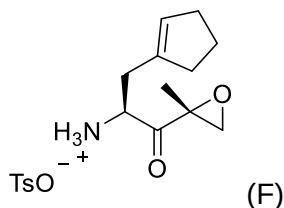
[0098] A una solución de (2S,3R)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)propanamido)propanoato de bencilo (compuesto "D") (5,04 kg como una solución 34,5 % en peso en THF) se añadió THF (3,25 kg) seguido por metanol (7,0 kg). Se estableció una atmósfera de N₂ dentro del recipiente de reacción y se añadió Pd/C (10 %, 473 g) bajo protección de nitrógeno. THF (500 g) y metanol (1 kg) se añadieron para lavar el recipiente de reacción y se estableció una atmósfera de H₂ (15 psi). La reacción se agitó durante 4 h a 17 °C, luego se filtró a través de diatomita. La torta húmeda se lavó con metanol (30 kg), se concentró a 3-4 volúmenes, se extrajo con THF (4 x 45 kg), y se calentó a 60-70 °C. Después de 2 h la temperatura se ajustó

a 50-60 °C y se añadió THF (30 kg). La mezcla se calentó de nuevo a 60-70 °C durante 2 h. A esta solución se añadió agua (370 kg) a 60-70 °C, luego la mezcla se enfrió a 55-65 °C. Se añadió cristal semilla (18,0 g) y la mezcla se agitó a 55-65 °C durante 1 h. La suspensión se concentró dos veces a 5-6 volúmenes y se agitó durante 2 h a 0 °C. La mezcla se filtró usando THF (10 kg) para lavar. La torta húmeda se secó para proporcionar un polimorfo cristalino del compuesto E (3,54 kg, 97,6 % de pureza). Los datos característicos de DSC, TGA, y XRPD se muestran en las Figuras 2-4.

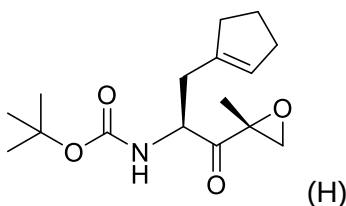
Ejemplo 6: Síntesis a pequeña escala del Compuesto E

[0099] A una solución del compuesto D (5,8 g, 11,6 mol) en THF (120 ml) se añadió Pd/C (1,5 g, 10 %). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de H₂ (1 atm) a temperatura ambiente durante la noche luego se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se lavó con EtOAc (20 ml) para proporcionar el Compuesto E (4,8 g, ~100 % de rendimiento) como un sólido incoloro.

Ejemplo 7: Preparación en gran escala de la sal tosilato de la sal de (S)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-aminio (compuesto "F")



[00100] A una solución de ((S)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *ter*-butilo (compuesto "H"):



(134 g) en DCM (402 ml) a 0 °C se añadió TFA (414,3 g, 8 eq) a una tasa para mantener la temperatura interna a -5-5 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a esta temperatura bajo N₂. La mezcla oscura luego se concentró para eliminar DCM y TFA a 15-25 °C. La solución se extrajo con metil *ter*-butil éter ("MBTE") (5 x 2L). El análisis de HPLC indicó que 2,72 eq de TFA permanecieron en la solución y se añadió MTBE (804 ml) a 15-25 °C. A esta solución a 0 °C se añadió ácido *p*-toluensulfónico ("PTSA") (83,6 g) y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 10-12 h. La mezcla luego se filtró a 0 °C, se lavó con MTBE (3 x 268 ml luego 1 x 168 ml), y la torta de filtración se secó bajo vacío a 15-25 °C durante 16-18 h para proporcionar compuesto F (126 g, 99,4 % de pureza) como la sal tosilato. Las curvas características de DSC y TGA se muestran

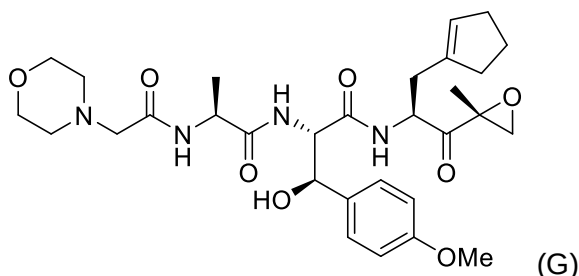
en las Figuras 5 y 6, y un patrón XRPD característico se puede hallar en la Figura 9.

Ejemplo 8: Síntesis a pequeña escala de la sal naftalensulfonato del Compuesto F

[00101] Al compuesto H (2 g) se añadió DCM (8 ml) y la mezcla se enfrió a 5 °C. TFA (8 ml) se añadió a una tasa para mantener la temperatura interna por debajo de 10 °C. La mezcla luego se agitó a temperatura ambiente durante 30 min luego se concentró bajo vacío. Se añadió tolueno (3 x 5 ml) para eliminar el exceso de TFA. A la sal TFA se añadió EtOAc (4 ml) seguido por ácido 2-naftalensulfónico (6,78 mmol, 1,41 g, disuelto en 10 ml de EtOAc). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y un sólido incoloro precipitó en 5 min. La mezcla se agitó unos 15 minutos adicionales, luego se filtró usando EtOAc (10 ml) para enjuagar. El sólido se colocó bajo vacío durante 16 h para proporcionar la sal naftalensulfonato como un sólido incoloro (1,62 g, 72 % de rendimiento). Los datos de DSC y TGA característicos se muestran en las Figuras 7 y 8.

[00102] Se usó un procedimiento similar para generar el ácido 4-nitrobencensulfónico del Compuesto F.

Ejemplo 9: Preparación en gran escala de (2S,3R)-N-[(2S)-3-(ciclopent-1-en-1-il)-1-[(2R)-2-metiloxiran-2-il]-1-oxopropan-2-il]-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-2-[(2S)-2-[2-(morfolin-4-il)acetamido]propanamido]propanamida (Compuesto "G")



[00103] Al Compuesto E (110,0 g) y el Compuesto F (sal tosilato, 110,0 g) se añadió DCM (1,46 kg) y la suspensión se enfrió a -15 a -5 °C. Se añadió DIPEA (122,1 g) a una tasa para mantener la temperatura interna de -15 a -5 °C. La mezcla luego se agitó durante 10 min y a esta solución se añadió HATU (114,4 g) a -15 a -5 °C bajo nitrógeno. La mezcla se agitó durante 2 h a -15 a -5 °C y se añadió el Compuesto F (3,91 g). Después de 10 min, la temperatura interna se ajustó a 5 a 15 °C luego se añadió agua (1100 g). La solución se agitó durante 30-60 min y se dejó decantar durante 30-60 min. La capa orgánica se separó y se lavó con agua (1100 g) durante 30-60 min y la mezcla se dejó decantar durante 30-60 min. Las fases orgánicas se combinaron y la temperatura se elevó a 15 a 25 °C. La solución se concentró a 2-4 volúmenes bajo vacío (< 45 °C). iPrOAc (957 g) se añadió y la solución se concentró a 2-4 volúmenes bajo

vacío (< 45 °C). La solución se lavó con KH₂PO₄ 5 % (acuoso, 1100 g), KH₂PO₄ 1 % (acuoso, 2 x 1100 g), NaHCO₃ 7 % (acuoso, 1100 g), y Na₂SO₄ 5 % (acuoso, 1100 g). El producto se proporcionó como una solución 10,53 % en peso en iPrOAc (89,8 %).

Ejemplo 10: Preparación en pequeña escala del Compuesto G

[00104] HATU (5,35 g, 14,1 mmol) y DIPEA (9,55 ml, 58,7 mmol) se añadieron a una solución del compuesto E (4,8 g, 11,7 mmol) y el Compuesto F (sal TFA, 3,46 g, 11,7 mmol) en DMF (90 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna flash sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1 a EtOAc) para proporcionar el Compuesto G (4,8 g, 70 % de rendimiento, 95,2 % de pureza por HPLC) como un sólido incoloro. LC/MS (LRMS(MH) m/z: 587).

Ejemplo 11: Preparación de un cristal único de la sal tosilato del Compuesto F

[00105] La sal TFA del compuesto F (0,70 g, 2,39 mmol) se disolvió en MTBE (3,5 ml) y se añadió ácido p-toluensulfónico (0,45 g, 2,39 mmol). La solución se selló en un vial y se dejó decantar a temperatura ambiente. Después de 9 meses, el solvente se eliminó de los cristales precipitados y el sólido se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 días. Véase Flack, H. D.; Bernardinelli, G. *The Use of X-Ray Crystallography to Determine Absolute Configuration. Chirality*, **2008**, 20, 681-690.

Ejemplo 12: Comparación de estabilidad de ácido trifluoroacético y sales tosilato del Compuesto F

[00106] La estabilidad de las sales de trifluoroacético y tosilato del compuesto F se determinó mediante la exposición de múltiples lotes de cada sal a una temperatura de 25 °C a una humedad relativa del 40 % durante uno o noventa días y la determinación del porcentaje en que cada muestra se había descompuesto. Como se muestra en la tabla siguiente, la sal tosilato del compuesto F es significativamente más estable que su equivalente de ácido trifluoroacético.

Forma	Lote #	% Pureza a t = 0	% Pureza en el tiempo indicado (días)	% Descomposición
Tosilato	1	97,2	96,0 (90)	1,2
	2	88,6	85,0 (90)	3,6
Trifluoroacetato	3	85,3	79,6 (1)	5,7
	4	94,8	86,0 (1)	8,8

[00107] La descripción anterior se proporciona solo por claridad de comprensión, y no se deben entender limitaciones innecesarias a partir de ella, ya que las

modificaciones dentro del alcance de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la técnica.

[00108] A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, la palabra "comprender" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

[00109] A lo largo de la memoria descriptiva, donde se describen composiciones que incluyen componentes o materiales, se contempla que las composiciones también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación de los componentes o materiales citados, a menos que se describa de otro modo. Del mismo modo, cuando se describen métodos que incluyen etapas particulares, se contempla que los métodos también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación de las etapas citadas, a menos que se describa de otro modo. La invención descrita de forma ilustrativa en la presente se puede practicar en la ausencia de cualquier elemento o etapa que no se describe específicamente en la presente.

[00110] La práctica de un método descrito en la presente, y etapas individuales de la misma, se puede realizar manualmente y/o con la ayuda o automatización proporcionada por equipos electrónicos. Aunque los procesos se han descrito con referencia a formas de realización particulares, una persona experta en la técnica apreciará fácilmente que se pueden usar otras formas de realizar los actos asociados con los métodos. Por ejemplo, el orden de varias de las etapas se puede cambiar sin apartarse del alcance o espíritu del método, a menos que se describa de otro modo. Además, algunas de las etapas individuales se pueden combinar, omitir o subdividir adicionalmente en etapas adicionales.

[00111] Todas las patentes, publicaciones y referencias citadas en el presente documento se incorporan por completo como referencia. En caso de conflicto entre la presente descripción y las patentes, publicaciones y referencias incorporadas, debe regir la presente descripción.