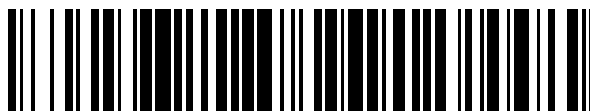


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 441**

51 Int. Cl.:  
**C07D 215/56** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05726243 .8**  
96 Fecha de presentación: **19.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1636190**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Cristal estable del compuesto 4-oxoquinolina**

30 Prioridad:  
**20.05.2004 JP 2004150979**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.10.2012**

73 Titular/es:  
**JAPAN TOBACCO, INC.**  
**2-1, TORANOMON 2-CHOME, MINATO-KU**  
**TOKYO 105-8422, JP**

72 Inventor/es:  
**SATOH, Motohide;**  
**MOTOMURA, Takahisa;**  
**MATSUDA, Takashi;**  
**KONDO, Kentaro;**  
**ANDO, Koji;**  
**MATSUDA, Koji;**  
**MIYAKE, Shuji y**  
**UEHARA, Hideto**

74 Agente/Representante:  
**Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 388 441 T3

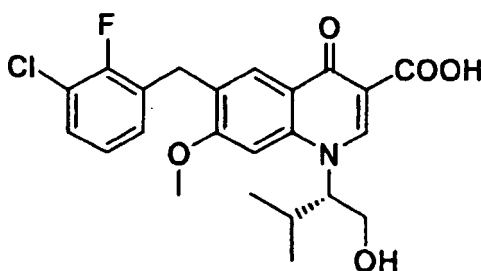
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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**

Cristal estable del compuesto 4-oxoquinolina

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un cristal estable de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroxitil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico.



10 (en lo sucesivo a menudo en este documento será el compuesto A) y un cristal mixto del mismo. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el cristal o el cristal mixto.

**Antecedentes de la invención**

15 El presente Solicitante ha descrito en la Patente Japonesa N° 3567162 presentada por el mismo Solicitante que el compuesto A que se ha mencionado anteriormente posee una acción inhibitoria en integrasa que es una enzima esencial para el crecimiento del VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), que es un virus causante del SIDA (Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida), y muestra un efecto anti-VIH (particularmente el Ejemplo 4-32 y el Ejemplo Experimental).

20 En general, cuando se usa un compuesto como un producto farmacéutico, se requiere la estabilidad química y física del compuesto para mantener la calidad y/o facilitar la conservación. No sólo la composición farmacéutica final sino también es deseable que un compuesto como material de partida sintético sea química y físicamente estable por las mismas razones.

25 Por consiguiente, dicho compuesto es preferiblemente un cristal, particularmente preferiblemente un cristal estable. Cuando el compuesto posee polimorfismo cristalino, generalmente se selecciona el cristal más estable.

30 Mientras la solicitud que se ha mencionado anteriormente describe el compuesto A, no se observa ninguna descripción concreta con respecto a la forma cristalina del compuesto A.

**Sumario de la invención**

35 Por lo tanto, los presentes inventores han estudiado diversas formas cristalinas del compuesto A en un intento por encontrar un cristal estable del compuesto A. Como resultado, han descubierto que el compuesto A posee polimorfismo cristalino, y un cristal del compuesto A que tiene una forma cristalina particular es útil como cristal estable, y en base a los hallazgos, han completado la presente invención.

40 Por consiguiente, la presente invención provee lo que se indica a continuación.

[1] Un cristal (forma cristalina II) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroxitil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos de difracción característicos en ángulos de difracción  $2\theta(^{\circ})$  de 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22° medidos por un difractómetro de polvo de rayos X;

45 [2] un cristal (forma cristalina III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroxitil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos de difracción característicos en ángulos de difracción  $2\theta(^{\circ})$  de 8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74° medido por un difractómetro de polvo de rayos X;

50 [3] un cristal (forma cristalina III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroxitil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, que posee una temperatura de inicio extrapolada de  $162,1 \pm 5,0^{\circ}\text{C}$ ;

[4] el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [3] que se han mencionado anteriormente, que posee una pureza de cristal no inferior al 70%;

[5] un cristal mixto que comprende el cristal del punto 1 que se ha mencionado anteriormente y el cristal de los puntos [2] o [3] que se han mencionado anteriormente;

55 [6] el cristal mixto del punto [5] que se ha mencionado anteriormente, en el que la pureza de cristal no es inferior del

70%;

[7] una composición farmacéutica que comprende el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [4] que se han mencionado anteriormente o el cristal mixto de los puntos [5] o [6] que se han mencionado anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

5 [8] un inhibidor de integrasa que comprende el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [4] que se han mencionado anteriormente o el cristal mixto de los puntos [5] o [6] que se han mencionado anteriormente como ingrediente activo;

10 [9] un agente antivírico que comprende el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [4] que se han mencionado anteriormente o el cristal mixto de los puntos [5] o [6] que se han mencionado anteriormente como ingrediente activo;

[10] un agente anti-VIH que comprende el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [4] que se han mencionado anteriormente o el cristal mixto de los puntos [5] o [6] que se han mencionado anteriormente como ingrediente activo;

15 [11] una composición anti-VIH que comprende el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [4] que se han mencionado anteriormente o el cristal mixto de los puntos [5] o [6] que se han mencionado anteriormente y uno o más tipos de otras sustancias activas anti-VIH como ingredientes activos; y

[12] un agente anti-VIH para una terapia multifármaco con otro agente anti-VIH, que comprende el cristal de cualquiera de los puntos [1] a [4] que se han mencionado anteriormente o el cristal mixto de los puntos [5] o [6] que se han mencionado anteriormente como ingrediente activo.

20

### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra múltiples registros de patrones de difracción del polvo de rayos X, en los que la línea superior muestra el patrón de difracción de la forma cristalina III, la línea central muestra el patrón de difracción de la forma cristalina I, la línea inferior muestra el patrón de difracción de la forma cristalina II, el eje vertical muestra la intensidad de difracción (cps: recuentos por segundo: intervalos de escala son 2500 cps) y el eje transversal muestra el ángulo de difracción  $2\theta(^{\circ})$ .

30 La figura 2 muestra múltiples registros del patrón de difracción de polvo de rayos X obtenido de la muestra después de 3 días de conservación de la prueba de estabilidad de la forma cristalina I. Para comparación, la línea superior muestra el patrón de difracción (condiciones iniciales) de la forma cristalina II, y la línea inferior muestra el patrón de difracción (condiciones iniciales) de la forma cristalina I. Desde la segunda línea se muestran los patrones de difracción en la condición de conservación N° 6 (60 °C/H.R. al 75%, recipiente abierto, 3 semanas de conservación), condición de conservación N° 4 (60 °C, recipiente con tapón, 3 semanas de conservación), condición de conservación N° 5 (60 °C, recipiente abierto, 3 semanas de conservación), condición de conservación N° 3 (80 °C, recipiente abierto, 3 días de conservación) y condición de conservación N° 2 (80 °C, recipiente con tapón, 3 días de conservación). El eje vertical muestra la intensidad de difracción (cps: recuentos por segundo: intervalos de escala son 2500 cps) y el eje transversal muestra el ángulo de difracción  $2\theta(^{\circ})$ .

### 40 Efecto de la invención

45 El cristal o cristal mixto del compuesto A de la presente invención tiene la forma cristalina particular que se ha mencionado anteriormente y es superior en estabilidad física y química, lo que a su vez tiene la ventaja del mantenimiento de la calidad del compuesto A a largo plazo, lo hace posible facilitar la conservación. Adicionalmente, tienen la ventaja que es fácil la manipulación durante la producción de diversas composiciones farmacéuticas y el volumen, lo que reduce el coste de producción.

### Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se explica en detalle a continuación.

55 En la presente invención, la "forma cristalina II" del compuesto A significa un cristal del compuesto A que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos de difracción característicos en ángulos de difracción  $2\theta(^{\circ})$  de 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22° medidos por difractómetro de polvo de rayos X.

En la presente invención, la "forma cristalina III" del compuesto A significa un cristal del compuesto A que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos de difracción característicos a ángulos de difracción  $2\theta(^{\circ})$  de 8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74° medidos por difractómetro de polvo de rayos X.

60 El valor máximo de difracción en el ángulo de difracción  $2\theta(^{\circ})$  que se ha mencionado anteriormente puede mostrar un ligero error de medición debido a los instrumentos de medición o las condiciones de medición y similares. Para ser específico, el error de medición puede estar dentro del intervalo de  $\pm 0,2$ , preferiblemente  $\pm 0,1$ , más preferiblemente  $\pm 0,06$ .

65 El cristal del compuesto A de la presente invención también se caracteriza por análisis térmico. Por ejemplo, cuando

la forma cristalina III del compuesto A de la presente invención se somete a Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), la entalpía del pico endotérmico es de aproximadamente 81 J/g, y la temperatura de inicio extrapolada es de  $162,1 \pm 5,0$  °C, preferiblemente  $162,1 \pm 3,0$  °C, más preferiblemente  $162,1 \pm 1,0$  °C, donde la "temperatura de inicio extrapolada" significa, como se define por JIS K 7121 (método de medición de temperatura de transferencia del plástico), la temperatura en una intersección de la medida inicial extrapolada del lado de temperatura inferior hacia el lado de temperatura más alta con la línea tangente dibujada en el punto que muestra la máxima pendiente en el borde principal del pico de fusión en un lado de temperatura inferior en una curva DSC. Cuando la entalpía y la temperatura de inicio extrapolada del pico endotérmico están dentro del intervalo que se ha mencionado anteriormente, el cristal del compuesto A es estable.

El cristal del compuesto A de la presente invención puede ser una forma cristalina II o una forma cristalina III, o un cristal mixto de una forma cristalina II y una forma cristalina III. Para su uso en un producto farmacéutico del compuesto A y similar, es preferible la forma cristalina II o la forma cristalina III porque son cristales estables, y es más preferible una forma cristalina III porque es el cristal más estable. Además, es preferiblemente una forma cristalina II en vista de la capacidad de absorción por los organismos vivos en administración como composición farmacéutica.

En la presente invención, la "pureza de cristal" se refiere a la pureza de la forma cristalina II o la forma cristalina III del compuesto A. En el caso de un cristal mixto de una forma cristalina II y una forma cristalina III, se refiere a la proporción de cristal con respecto a la cantidad total de sustancia de una forma cristalina II y una forma cristalina III. La pureza del cristal de la presente invención puede determinarse, por ejemplo, mediante métodos conocidos, tales como difracción de rayos X, análisis térmico y similar. La pureza del cristal o el cristal mixto de la presente invención no ha de ser necesariamente del 100%, y no puede ser inferior del 70%, preferiblemente no inferior del 80%, más preferiblemente no inferior del 90%, aún más preferiblemente no inferior del 95%, y mucho más preferiblemente no inferior del 98%. Es preferible la pureza dentro de este intervalo para garantizar la calidad.

El cristal o cristal mixto del compuesto A de la presente invención puede administrarse a un mamífero (ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, cabra, mono, etc.) y similares como diversas composiciones farmacéuticas tales como agentes anti-VIH, inhibidores de la integrasa del VIH, agentes antivirales y similares usados, por ejemplo, para la profilaxis y/o el tratamiento del SIDA.

Cuando el cristal o cristal mixto del compuesto A de la presente invención se usa como una composición farmacéutica, este se mezcla con vehículos, excipientes, diluyentes, agentes de propagación, disgregantes, estabilizantes, conservantes, tampones, emulsionantes, agentes saporíferos, agentes colorantes, agentes edulcorantes, espesantes, correctores, ayudantes de disolución y otros aditivos farmacéuticamente aceptables, generalmente en sí conocidos, tales como agua, aceite vegetal, alcohol (por ejemplo, etanol o alcohol bencílico, etc.), polietilenglicol, triacetato de glicerol, gelatina, carbohidrato (por ejemplo, lactosa, almidón, etc.), estearato de magnesio, talco, lanolina, vaselina y similares, formados en comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, supositorios, inyecciones, gotas oculares, líquidos, cápsulas, trociscos, aerosoles, elixires, suspensiones, emulsiones, jarabes y similares mediante un procedimiento convencional y administrarse por vía sistémica o tópica y por vía oral o parenteral.

Aunque la dosis varía dependiendo de la edad, del peso corporal, de los síntomas, del efecto de tratamiento, del procedimiento de administración y similares, esta es generalmente de 0,01 mg a 1 g por administración para un adulto, que se proporciona de una a varias veces al día, por vía oral, o en una forma de dosificación de una inyección tal como inyección intravenosa y similar.

Generalmente, para prolongar su efecto durante un largo tiempo, se requiere un agente anti-VIH, de manera este sea eficaz no solo para la supresión temporal del crecimiento viral sino también para la prohibición del nuevo crecimiento viral. Esto significa que es necesaria una administración prolongada y que una sola dosis alta puede ser frecuentemente inevitable para prolongar el efecto durante un periodo de tiempo más largo durante la noche y similares. Dicha administración de dosis alta y prolongada aumenta el riesgo de efectos secundarios.

En vista de esto, uno de los modos preferentes de la presente invención es que tal compuesto permita una alta absorción por administración oral, y que tal compuesto sea capaz de mantener la concentración en sangre del compuesto administrado durante un periodo de tiempo prolongado.

Por "profilaxis del SIDA" se entiende, por ejemplo, la administración de un agente farmacéutico a un individuo que ha resultado ser positivo al VIH pero que aun no ha desarrollado la patología del SIDA, la administración de un agente farmacéutico a un individuo que presenta una patología del SIDA mejorada después del tratamiento pero que es portador del VIH aún no erradicado y cuya recaída del SIDA es preocupante, y administración de un agente farmacéutico por el temor de una posible infección.

La composición anti-VIH de la presente invención se usa, por ejemplo, para una terapia del SIDA de combinación de fármacos múltiple. Los ejemplos de la "otra sustancia activa anti-VIH" para usar para la composición anti-VIH incluyen, un anticuerpo anti-VIH, una vacuna contra el VIH, inmunostimulantes tales como interferón y similares,

una ribozima contra el VIH, un fármaco antisentido contra el VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH, un inhibidor de la proteasa del VIH, un inhibidor de enlace entre un receptor de enlace (CD4, CXCR4, CCR5 y similares) de una célula hospedadora reconocida por un virus y el virus y similares.

- 5 Los ejemplos específicos del inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH incluyen Retrovir (R) (zidovudina), Eпивir (R) (lamivudina), Zerit (R) (sanilvudina), Videx (R) (didanosina), Hivid (R) (zalcitabina), Ziagen (R) (sulfato de abacavir), Viramure (R) (nevirapina), Stocrin (R) (efavirenz), Rescriptor (R) (mesilato de delavirdina), Combivir (R) (zidovudina+lamivudina), Trizivir (R) (sulfato de abacavir + lamivudina + zidovudina), Coactinon (R) (emivirina), Fosfonovir (R), Coviracil (R), alovudina (3'-fluoro-3'-desoxitimidina), Tiovir (ácido tiofosfonofórmico), Capravirina (ácido 5-[(3,5-diclorofenil)tio]-4-isopropil-1-(4-piridilmetil)imidazol-2-metanol carbámico), Tenofovir disoproxil fumarato (ácido(R)-[[2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi]metil]fosfórico bis (isopropoxicarboniloximetil)éster fumarato), DPC-083 ((4S)-6-cloro-4-[(1E)-ciclopropiletinil]-3,4-dihidro-4-trifluorometil-2(1H)-quinazolinona), DPC-961 ((4S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-3,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2(1H)-quinazolinona), DAPD ((-)-β-D-2,6-diaminopurina dioxolano), Immunocal, MSK-055, MSA-254, MSH-143, NV-01, TMC-120, DPC-817, GS-7340, TMC-125, SPD-754, D-A4FC, 15 capravirina, UC-781, emtricitabina, alovudina, Fosfazid, UC-781, BCH-10618, Etravirina, BCH-13520, MIV-210, sulfato de Abacavir /lamivudina, GS-7340, GW-5634, GW-695634 y similares en el que (R) significa una marca registrada (en el presente documento en lo sucesivo la misma) y los nombres de otros agentes farmacéuticos son nombres generales.
- 20 Los ejemplos específicos del inhibidor de la proteasa del VIH incluyen Crixivan (R) (indinavir sulfato etanolato), saquinavir, Invirasa (R) (mesilato de saquinavir), Norvir (R) (ritonavir), Viracept (R) (mesilato de nelfinavir), lopinavir, Prozei (R) (amprenavir), Kaletra (R) (ritonavir+lopinavir), dimesilato de mozenavir ([4R-(4α,5α,6β)]-1,3-bis[(3-aminofenil)metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bis(fenilmetil)-2H-1,3-diazepin-2-ona dimetanosulfonato), tipranavir (3'-[(1R)-1-[(6R)-5,6-dihidro-4-hidroxi-2-oxo-6-feniletil-6-propil-2H-piran-3-il]propil]-5-(trifluorometil)-2-piridinossulfamida), 25 lasinavir (N-[5(S)-(terc-butoxicarbonilamino)-4(S)-hidroxi-6-fenil-2(R)-(2,3,4-trimetoxibencil)hexanoil]-L-valina 2-metoxietilnamida), KNI-272 ((R)-N-terc-butyl-3-[(2S,3S)-2-hidroxi-3-N- [ (R) -2-N-(ilsoquinolin-5-iloxiacetil)amino-3-metiltiopropanoil]amino-4-fenilbutanoil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxamida), GW-433908, TMC-126, DPC-681, buckminsterfullereno, MK-944A (MK944(N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-fenilmetil-4(S)-hidroxi-5-[4-(2-benzo[b]furanilmetil)-2(S)-(terc-butylcarbamoil)piperazin-1-il]pentanamida) + sulfato de indinavir), JE-2147 ([2(S)-oxo-4-fenilmetil-3(S)-[(2-metil-3-oxi)fenilcarbonilamino]-1-oxabutil]-4-[(2-metilfenil)metilamino]carbonil-4(R)-5,5-dimetil-1,3-tiazol), ester dimetilico del ácido BMS-232632 ((3S,8S,9S,12S)-3,12-bis (1,1-dimetiletil) -8-hidroxi-4,11-dioxo-9- (fenilmetil)-6-[[4-(2-piridinil)fenil]metil]-2,5,6,10,13-pentaazatetradecanodicarboxílico), DMP-85 ((4R,5S,6S,7R)-1-(3-amino-1H-indazol-5-ilmetil)-4,7-dibencil-3-butyl-5,6-dihidroxiperhidro-1,3-diazepin-2-ona), DMP-851, RO-0334649, Nar-DG-35, R-944, VX-385, TMC-114, Tipranavir, 35 Fosamprenavir sódico, Fosamprenavir cálcico, Darunavir, GW-0385, R-944, RO-033-4649, AG-1859 y similares.

- El inhibidor de integrasa del VIH se ilustra por S-1360, L-870810 y similares, el inhibidor de la ADN polimerasa o el inhibidor de la síntesis de ADN se ilustra por Foscavir (R) , ACH-126443 (L-2',3'-didehidro-dideoxi-5-fluorocitidina), entecavir ((1S,3S,4S)-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenciclopentil]guanina), calanolida A ([10R-(10α,11β,12α)-11,12-dihidro-12-hidroxi-6,6,10,11-tetrametil-4-propil-2H,6H,10H-benzo[1,2-b:3,4-b':5,6-b'']tripiran-2-ona), calanolida B, NSC-674447 (1,1'-azobisformamida), Iscador (extracto de *Viscum album*), Rubitecan y similares, el fármaco antisentido contra el VIH se ilustra por HGTV-43, GEM-92 y similares, el anticuerpo anti-VIH y otros anticuerpos se 40 ilustran por NM-01, PRO-367, KD-247, Cytolin (R), TNX-355 (anticuerpo CD4), AGT-1, PRO-140 (anticuerpo CCR5), mAb anti-CTLA-4 y similares, la vacuna contra el VIH y otras vacunas se ilustran por ALVAC (R), AIDSVAX (R), Remune (R), vacuna contra la gp41 del VIH, vacuna contra la gp120 del VIH, vacuna contra la gp140 del VIH, vacuna contra la gp160 del VIH, vacuna contra p17 del VIH, vacuna contra p24 del VIH, vacuna contra p55 del VIH, Sistema Vectorial AlfaVax, vacuna canarypox contra la gp160, AntiTat, vacuna MVA-F6 Nef, vacuna VIHrev, péptido C4-V3, p2249f, VIR-201, HGP-30W, TBC-3B, PARTICULA-3B y similares, Antiferón (vacuna interferón-α) y similares, el interferón o agonistas de interferón se ilustran por Sumiferón (R), MultiFerón (R), interferón-τ, 50 Reticulosa, interferón α leucocitario humano y similares, el antagonista de CCR5 se ilustra mediante SCH-351125 y similares, el agente farmacéutico de acción sobre p24 del VIH se ilustra por GPG-NH2 (glicil-propil-glicinamida) y similares, el inhibidor de fusión del VIH se ilustra por FP-21399 (1,4-bis[3-[[2,4-diclorofenil]carbonilamino]-2-oxo-5,8-disodio sulfonil]naftil-2,5-dimetoxifenil,4-dihidrazona), T-1249, Construcción Polimérica Sintética N° 3, pentafusida, FP-21399, PRO-542, Enfuvirtida y similares, el agonista o antagonista de IL-2 se ilustra por interleucina-2, Imunace (R), Proleucina (R), Multiquina (R), Ontak (R) y similares, el antagonista de TNF-α se ilustra por Thalomid (R) (talomida), Remicade (R) (infliximab), sulfato de curdlan, el inhibidor de α-glucosidasa se ilustra por Bucast (R) y similares, el inhibidor de purina nucleósido fosforilasa se ilustra por peldesina (2-amino-4-oxo-3H,5H-7-[(3-piridil)metil]pirrolo[3,2-d]pirimidina) y similares, el agonista o el inhibidor de la apoptosis se ilustra por Arkin Z(R), Panavir (R), Coenzima Q10 (2-deca(3-metil-2-butenileno)-5,6-dimetoxi-3-metil-p-benzoquinona) y similares, el inhibidor de colinesterasa se ilustra por Cognex (R) y similares, y el inmunomodulador se ilustra por Imunox (R), 60 Proquina (R), Met-enkefalina (6-de-L-arginina-7-de-L-arginina-8-de-L-valinamida-adrenorfina), WF-10 (solución de tetraclorodecaóxido diluida 10 veces), Perthon, PRO-542, SCH-D, UK-427857, AMD-070, AK-602 y similares.

- Además, se ilustran la Neurotropina (R) , Lidakol (R), Ancer 20 (R), Ampligen (R), Anticort (R), Inactivin (R) y 65 similares, PRO-2000, el gen Rev M10, célula T citotóxica específica del VIH ( inmunoterapia CTL, terapia de

protocolo ACTG 080, terapia génica CD4-ζ), proteína de unión a SCA, complejo RBC-CD4, Motexafin gadolinio, GEM-92, CNI-1493, (±)-FTC, Ushercell, D2S, BufferGel (R), VivaGel (R), gel vaginal Glyminox, laurel sulfato sódico, 2F5, 2F5/2G12, VRX-496, Ad5gag2, BG-777, IGIV-C, BILR-255 y similares.

- 5 Como la otra "sustancia con actividad anti-VIH" para usar para la composición anti-VIH de la presente invención en la terapia de combinación multifármaco, se prefiere el inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH y el inhibidor de la proteasa del VIH. Dos o tres o incluso un mayor número de agentes farmacéuticos puede usarse en combinación, en el que una combinación de agentes farmacéuticos que poseen diferentes mecanismos de acción es una de las realizaciones preferidas. Además, se prefiere la selección de agentes farmacéuticos libres de duplicidad de efectos secundarios.

Ejemplos específicos de la combinación de agentes farmacéuticos incluyen una combinación de un grupo que consiste en efavirenz, tenofovir, emtricitabina, indinavir, nelfinavir, atazanavir, ritonavir + indinavir, ritonavir + lopinavir y ritonavir + saquinavir, didanosina + lamivudina, zidovudina + didanosina, estavudina + didanosina, zidovudina + lamivudina, estavudina + lamivudina y emtriva, y el cristal o cristal mixto de la presente invención (normativa para el uso de agentes Antirretrovirales en adultos y adolescentes infectados por el VIH. 13 de agosto de 2001). Se prefiere particularmente un uso combinado de dos agentes del cristal o cristal mixto de la presente invención con efavirenz, indinavir, nelfinavir, tenofovir, emtricitabina, zidovudina o lamivudina, y un uso combinado de tres agentes del cristal o cristal mixto de la presente invención con zidovudina + lamivudina, tenofovir + lamivudina, tenofovir + zidovudina, tenofovir + efavirenz, tenofovir + nelfinavir, tenofovir + indinavir, tenofovir + emtricitabina, emtricitabina + lamivudina, emtricitabina + zidovudina, emtricitabina + efavirenz, emtricitabina + nelfinavir, emtricitabina + indinavir, nelfinavir + lamivudina, nelfinavir + zidovudina, nelfinavir + efavirenz, nelfinavir + indinavir, efavirenz + lamivudina, efavirenz + zidovudina o efavirenz + indinavir.

- 25 El método de producción del cristal o el cristal mixto del compuesto A de la presente invención no está particularmente limitado, y el cristal puede ser producido por un método conocido *per se* o métodos mostrados en los siguientes Ejemplos y similares.

### Ejemplos

- 30 Mientras el método de producción del cristal del compuesto A de la presente invención se explica como se indica a continuación con referencia a los Ejemplos, los cuales son simplemente ejemplos y no limitan de ningún modo la presente invención.

- 35 Ejemplo de Referencia 1: Producción de la forma cristalina I del compuesto A

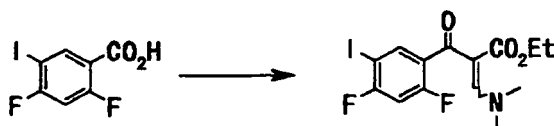
#### Etapa 1



- 40 Se disolvió ácido 2,4-difluorobenzoico (50 g, 316 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (200 ml) y se añadió en porciones N-yodosuccinimida (68 g, 300 mmol) a no más de 5 °C. Después de la finalización de la adición, la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 4,5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo-agua (aprox. 600 ml), después se añadió una solución acuosa al 10% de sulfito sódico y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para dar cristales en bruto (85 g). Los cristales en bruto obtenidos de la misma manera se combinaron (cantidad total de 205 g) y se recrystalizaron en etanol acuoso al 50%
- 45 (820 ml) para dar ácido 2,4-difluoro-5-yodobenzoico (148 g, rendimiento del 73%) en forma de un sólido de color blanco.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) (σ) ppm: 6,94 (1H, dd, J = 10,3, 10,3 Hz), 8,46 (1H, d, J = 7,5 Hz)

- 50 Etapa 2



- El compuesto (148 g, 521 mmol) obtenido en la Etapa 1 se disolvió en tolueno (750 ml), se añadieron cloruro de tionilo (76 ml, 1,04 mol) y dimetilformamida (cantidad catalítica) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. El material insoluble se retiró por filtración a 60 °C, el filtrado se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tolueno (330 ml). El residuo se disolvió en tetrahydrofurano (400 ml), esta solución se añadió gota a gota a una solución de 3,3-dimetilaminoacrilato de etilo (82 g, 573 mmol) y trietilamina (87 ml, 625 mmol) en tetrahydrofurano (400 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 7 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a

temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Se añadieron agua (700 ml) y acetato de etilo (800 ml) para el reparto. La capa orgánica se lavó sucesivamente con hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (250 ml, x 2), agua (300 ml) y salmuera saturada (300 ml) y se secó sobre sulfato sódico. Después de la filtración del material insoluble, el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (210 g) de éster etílico del ácido

### Etapa 3

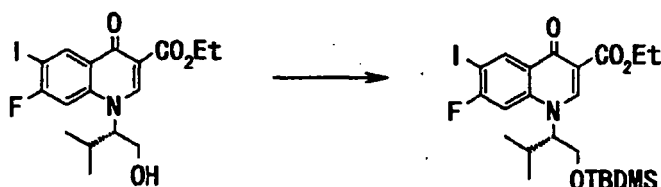


El producto en bruto (210 g) obtenido en la Etapa 2 se disolvió en tetrahidrofurano (500 ml), se añadió (S)-(+)-valinol (54 g, 521 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en dimetilformamida (600 ml). Se añadió carbonato potásico (144 g, 1,04 mol) y la mezcla se agitó con calentamiento a 70 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se añadió a agua (1500 ml) y se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración, el sólido obtenido se lavó sucesivamente con etanol acuoso al 30% (500 ml) y un disolvente mixto de éter dietílico (150 ml) y hexano (150 ml) y se secó al vacío para dar éster etílico del ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (178 g, rendimiento del 76%) en forma de un sólido de color beige.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,10 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,28 (3H, t, J = 7,0 Hz), 2,27 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,86 (1H, a), 4,23 (2H, c, J = 7,0 Hz), 4,56 (1H, a), 5,12 (1H, t, J = 4,9 Hz), 8,09 (1H, d, J = 11,1 Hz), 8,62 (1H, d, J = 7,5 Hz), 8,68 (1H, s)

MS (ESI): M+ 448

### Etapa 4



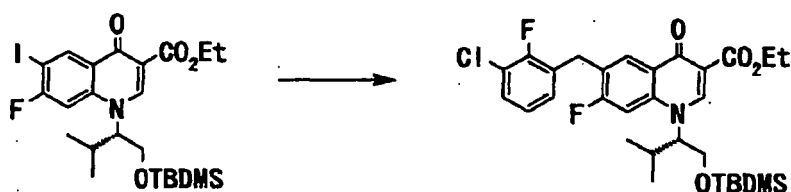
en la que TBDMS se refiere a un grupo terc-butildimetilsililo.

El compuesto (80 g, 179 mmol) obtenido en la Etapa 3 se disolvió en dimetilformamida (320 ml), se añadieron imidazol (16 g, 233 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (30 g, 197 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. A la mezcla de reacción se le añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:3 a 1:2) para dar éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (77 g, rendimiento del 77%) como una forma amorfa incolora.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz) (δ) ppm: -0,07 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,77 (9H, s), 0,84 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,18 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,40 (3H, t, J = 7,2 Hz), 2,35-2,50 (1H, m), 3,85-3,95 (1H, m), 3,98-4,10 (2H, m), 4,30-4,40 (2H, m), 7,26 (1H, s), 8,64 (1H, s), 8,94 (1H, d, J = 7,2 Hz)

MS (ESI): M+ 562

### Etapa 5



(Preparación de una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc en tetrahidrofurano)

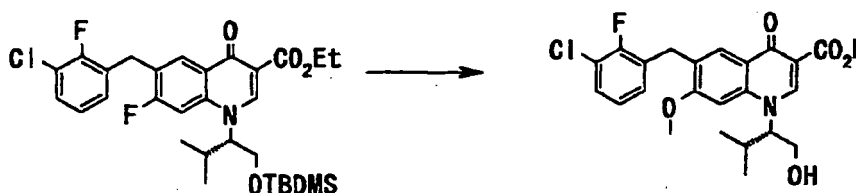
En una corriente de argón, se suspendió polvo de cinc (11 g, 267 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml), se añadieron 1,2-dibromoetano (0,15 ml, 1,8 mmol) y cloruro de trimetilsililo (0,45 ml, 3,6 mmol) a 65 °C y la mezcla se agitó con calentamiento durante 30 min. Se añadió gota a gota una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (41 g, 178 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) a 65 °C, la mezcla se agitó con calentamiento durante 2 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente para dar una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M en tetrahidrofurano. Ésta se usó en la siguiente etapa principal.

10 (Etapa principal)

El compuesto (76 g, 136 mmol) obtenido en la Etapa 4 se disolvió en tetrahidrofurano (600 ml) y, en una corriente de argón, se añadieron dibencilidenacetonalpaladio (II) (3,2 g, 5,5 mmol) y trifurilfosfina (2,6 g, 11,0 mmol) y se añadió gota a gota una solución del bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M que se ha mencionado anteriormente en tetrahidrofurano (178 ml, 178 mmol) a 60 °C. Después de la finalización de la adición gota a gota, la mezcla se agitó con calentamiento a la misma temperatura durante 2 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y la mezcla se filtró a través de celite. El filtrado se extrajo dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y salmuera saturada y se secó sobre sulfato de magnesio. La capa orgánica se filtró, el filtrado se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (cloroformo:acetona = 40:1) para dar éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (68 g, rendimiento del 84%) como una forma amorfa incolora.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz) (δ) ppm: -0,09 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,75 (9H, s), 0,85 (3H,d, J = 6,7 Hz), 1,18 (3H, d, 6,7 Hz), 1,39 (3H, t, J = 7,1 Hz), 2,45 (1H, a), 3,89-3,92 (1H, m), 3,98-4,02 (1H, m), 4,07-4,12 (1H, m), 4,12 (2H, s), 4,34-4,41 (2H, m), 6,96-7,00 (1H, m), 7,03-7,05 (1H, m), 7,21-7,24 (1H, m), 7,26-7,29 (1H, m), 8,39 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,63 (1H, s)

Etapa 6



30 El compuesto (48 g, 86 mmol) obtenido en la Etapa 5 se disolvió en metanol (300 ml), se añadieron agua (5 ml) y una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (176 ml, 862 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se neutralizó añadiendo ácido clorhídrico 6 N. El metanol se evaporó a presión reducida. A la solución obtenida se le añadió agua y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración y el sólido obtenido se disolvió en acetato de etilo. La mezcla se lavó con agua y se secó sobre sulfato sódico. La solución se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se recristalizó en acetato de etilo-hexano para dar un compuesto (32 g, rendimiento del 86%) en forma de un sólido de color blanco. El compuesto obtenido (32 g) se disolvió en acetato de butilo (160 ml) por calentamiento a reflujo y la forma cristalina II se pipeteó a 75 °C. La mezcla se agitó durante 3,5 h mientras se dejaba enfriar como tal. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetato de butilo (25 ml) y se secó al vacío para dar un compuesto (25 g, rendimiento del 77%) en forma de un sólido de color blanco. El compuesto obtenido (4,0 g) se disolvió en metanol (40 ml) por calentamiento a reflujo a 50 °C y se añadió gota a gota al agua (40 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, se filtró, el sólido restante se lavó con metanol acuoso al 66% y se secó al vacío para dar un cristal del compuesto A (forma cristalina I) (3,9 g, rendimiento del 97%) en forma de un sólido de color blanco.

p.f. 151-152 °C

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,16 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,30-2,50 (1H, m), 3,70-3,90 (1H, m), 3,90-4,00 (1H, m), 4,03 (3H, s), 4,12 (2H, s), 4,80-4,90 (1H, m), 5,19 (1H, t), 7,19-7,25 (2H, m), 7,46-7,51 (2H, m), 8,04(1H, s), 8,88 (1H, s), 15,44 (1H, s)

MS (ESI): M+ 448

55



## Ejemplo 1: Producción de la forma cristalina II del compuesto A

## Etapa 1

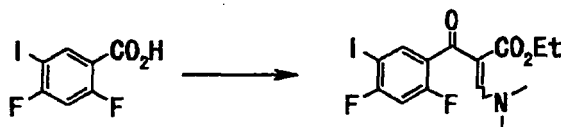


- 5 Se disolvió ácido 2,4-difluorobenzoico (50 g, 0,316 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (200 ml) y se añadió en porciones N-yodosuccinimida (68 g, 300 mmol) en porciones a no más de 5 °C. Después de la finalización de la adición, la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 4,5 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo-agua (aprox. 600 ml), después se añadió una solución acuosa al 10% de sulfito sódico y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para dar cristales en bruto (85 g). Los
- 10 cristales en bruto obtenidos de la misma manera se combinaron (cantidad total de 205 g) y se recrystalizaron en etanol acuoso al 50% (820 ml) para dar ácido 2,4-difluoro-5-yodobenzoico (148 g, rendimiento del 73%) en forma de un sólido de color blanco.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) (σ) ppm: 6,94 (1H, dd, J = 10,3, 10,3 Hz), 8,46 (1H, d, J = 7,5 Hz)

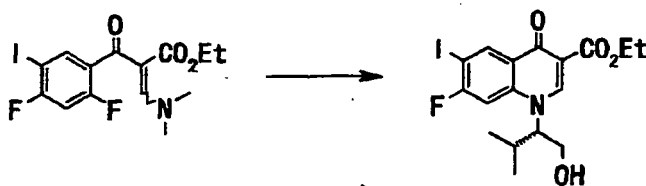
15

## Etapa 2



- El compuesto (148 g, 521 mmol) obtenido en la Etapa 1 se disolvió en tolueno (750 ml), se añadieron cloruro de tionilo (76 ml, 1,04 mol) y dimetilformamida (cantidad catalítica) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. El material insoluble se retiró por filtración a 60 °C, el filtrado se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tolueno (330 ml). El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (400 ml), esta solución se añadió gota a gota a una solución de 3,3-dimetilaminoacrilato de etilo (82 g, 573 mmol) y trietilamina (87 ml, 625 mmol) en tetrahidrofurano (400 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 7 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Se añadieron agua (700 ml) y acetato de etilo (800 ml)
- 20 para permitir la división. La capa orgánica se lavó sucesivamente dos veces con hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (250 ml), agua (300 ml) y salmuera saturada (300 ml) y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (210 g) de éster etílico del ácido 2-(2,4-difluoro-5-yodobenzoil)-3-dimetilaminoacrílico en forma de un sólido de color pardo.

## Etapa 3



- El producto en bruto (210 g) obtenido en la Etapa 2 se disolvió en tetrahidrofurano (500 ml), se añadió (S)-(+)-valinol (54 g, 0,521 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en dimetilformamida (600 ml). Se añadió carbonato potásico (144 g, 1,04 mol) y la mezcla se agitó con calentamiento a 70 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió a agua (1500 ml) y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido obtenido se lavó sucesivamente con etanol acuoso al 30% (500 ml) y un disolvente mixto de éter dietílico (150 ml) y hexano (150 ml), y se secó al vacío para dar éster etílico del ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroxi-2-metilpropil)-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (178 g, rendimiento del 76% (con respecto a la Etapa 2)) en forma de un sólido de color beige.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) (δ) ppm: 0,72(3H, d, J = 6,6 Hz), 1,10 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,28(3H, t, J = 7,0 Hz), 2,27 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,86(1H, a), 4,23 (2H, c, J = 7,0 Hz), 4,56(1H, a), 5,12 (1H, t, J = 4,9 Hz), 8,09(1H, d, J = 11,1 Hz), 8,62 (1H, d, J = 7,5 Hz), 8,68(1H, s)

45

MS (ESI): M+ 448

## Etapa 4



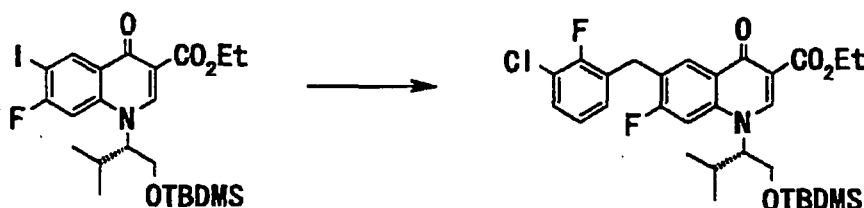
El compuesto (150 g, 335 mmol) obtenido en la Etapa 3 se disolvió en dimetilformamida (500 ml), se añadieron imidazol (30 g, 0,436 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (56 g, 369 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. A la mezcla de reacción se le añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, una solución acuosa saturada de amonio y salmuera saturada y se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se filtró, el filtrado se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:3 a 1:2) para dar éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (173 g, rendimiento del 92%) como una forma amorfa incolora.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: -0,07 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,77 (9H, s), 0,84 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz), 1,18 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz), 1,40 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz), 2,35-2,50 (1H, m), 3,85-3,95 (1H, m), 3,98-4,10 (2H, m), 4,30-4,40 (2H, m), 7,26 (1H, s), 8,64 (1H, s), 8,94 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz)

15

MS (ESI):  $M + 562$

## Etapa 5



20 (Preparación de una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc en tetrahidrofurano)

En una corriente de argón, se suspendió polvo de cinc (11 g, 175 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml), se añadieron 1,2-dibromoetano (0,1 ml, 1,20 mmol) y cloruro de trimetilsililo (0,29 ml, 2,4 mmol) a 60 °C y la mezcla se agitó con calentamiento durante 30 min. Se añadió gota a gota una solución de 3-cloro-2-fluorobencilo bromuro (27 g, 119 mmol) en tetrahidrofurano (60 ml) a 60 °C. La mezcla se agitó con calentamiento durante 1 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente para dar una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M en tetrahidrofurano. Ésta se usó en la siguiente etapa principal.

25

(Etapa principal)

30

El compuesto (50 g, 89 mmol) obtenido en la Etapa 4 se disolvió en tetrahidrofurano (400 ml) y, en una corriente de argón, se añadió diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (2,1 g, 3,6 mmol) y se añadió gota a gota una solución del bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M que se ha mencionado anteriormente en tetrahidrofurano a 60 °C. Después de la finalización de la adición gota a gota, la mezcla se agitó con calentamiento a la misma temperatura durante 1,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió ácido clorhídrico 1 N y la mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua y salmuera saturada y se secó sobre sulfato de magnesio. La capa orgánica se filtró, el filtrado se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:2 a 1:1) para dar éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (43 g, rendimiento del 83%) como una forma amorfa de color pardo.

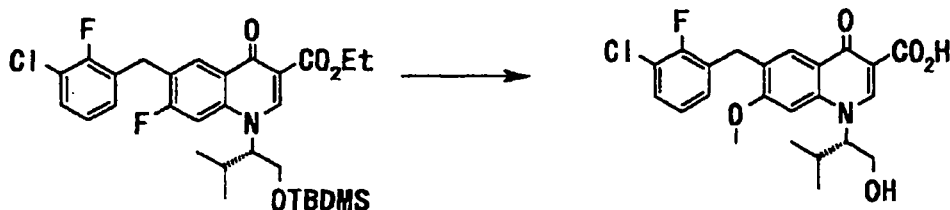
35

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: -0,09 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,75 (9H, s), 0,85 (3H, d,  $J = 6,7$  Hz), 1,18 (3H, d, 6,7 Hz), 1,39 (3H, t,  $J = 7,1$  Hz), 2,45 (1H, a), 3,89-3,92 (1H, m), 3,98-4,02 (1H, m), 4,07-4,12 (1H, m), 4,12 (2H, s), 4,34-4,41 (2H, m), 6,96-7,00 (1H, m), 7,03-7,05 (1H, m), 7,21-7,24 (1H, m), 7,26-7,29 (1H, m), 8,39 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz), 8,63 (1H, s)

40

45

## Etapa 6



El compuesto (43 g, 74 mmol) obtenido en la Etapa 5 se disolvió en metanol (280 ml), se añadieron una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (151 ml, 742 mmol) y agua (4,3 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 20 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite. El filtrado se concentró a presión reducida. Al residuo se le añadió agua (400 ml) y la mezcla se lavó con hexano (100 ml). La capa acuosa se acidificó añadiendo ácido clorhídrico concentrado (65 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua y salmuera saturada y se secó sobre sulfato sódico. La solución se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto en bruto obtenido (35 g, aceite de color pardo) se disolvió en acetato de etilo (49 ml) por calentamiento a reflujo, se añadió hexano (30 ml) mientras se dejó enfriar y la mezcla se agitó durante 18,5 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con un disolvente mixto de acetato de etilo y hexano (1:1) y se secó al vacío para dar un cristal del compuesto A (forma cristalina II) (27 g, rendimiento del 82%) en forma de un sólido de color blanco.

p.f. 153,7-153,9 °C

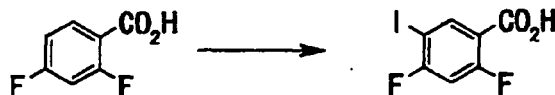
$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  300 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,72 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz), 1,16 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz), 2,30-2,50 (1H, m), 3,70-3,90 (1H, m), 3,90-4,00 (1H, m), 4,03 (3H, s), 4,12 (2H, s), 4,80-4,90 (1H, m), 5,19 (1H, t), 7,19-7,25 (2H, m), 7,46-7,51 (2H, m), 8,04 (1H, s), 8,88 (1H, s), 15,44 (1H, s)

MS (ESI):  $M^+$  448

## Ejemplo 2: Producción de la forma cristalina II del compuesto A

## Ejemplo 2-1: Producción de la forma cristalina II del compuesto A

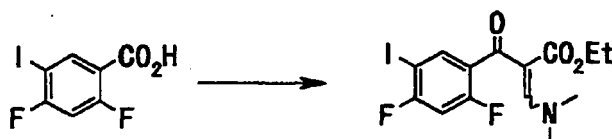
## Etapa 1



Se disolvió ácido 2,4-difluorobenzoico (100 g, 633 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (400 ml) y se añadió en porciones N-yodosuccinimida (142 g, 601 mol) a no más de 5 °C. Después de la finalización de la adición, la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 6 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo-agua (aprox. 2400 ml), después se añadió una solución acuosa saturada de sulfito sódico y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para dar cristales en bruto (188 g). Los cristales en bruto obtenidos de la misma manera se combinaron (cantidad total de 568 g) y se recrystalizaron en etanol acuoso al 50% (2600 ml) para dar ácido 2,4-difluoro-5-yodobenzoico (388 g, rendimiento del 68%) en forma de un sólido de color blanco.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) ( $\sigma$ ) ppm: 6,94 (1H, dd,  $J = 10,3, 10,3$  Hz), 8,46 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz)

## Etapa 2



El compuesto (200 g, 704 mmol) obtenido en la Etapa 1 se disolvió en tolueno (1000 ml), se añadieron cloruro de tionilo (103 ml, 408 mmol) y dimetilformamida (cantidad catalítica) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. El material insoluble se retiró por filtración, el filtrado se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tolueno. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (500 ml), esta solución se añadió gota a gota a una solución de 3,3-dimetilaminoacrilato de etilo (111 g, 775 mmol) y trietilamina (118 ml, 845 mmol) en tetrahidrofurano (500 ml), y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y el

filtrado se concentró a presión reducida. Se añadieron agua (500 ml) y acetato de etilo (800 ml) para permitir la división. La capa orgánica se lavó sucesivamente con hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (200 ml), agua (200 ml) y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (273 g) de éster etílico del ácido 2-(2,4-difluoro-5-yodobenzoil)-3-dimetilaminoacrílico en forma de un sólido de color pardo.

### Etapa 3



El producto en bruto (273 g) obtenido en la Etapa 2 se disolvió en tetrahidrofurano (650 ml), se añadió (S)-(+)-valinol (73 g, 708 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en dimetilformamida (800 ml). Se añadió carbonato potásico (195 g 1,41 mol) y la mezcla se agitó con calentamiento a 70 °C durante 2,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió a agua (2000 ml) y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido obtenido se sometió a lavado en suspensión sucesivamente con agua y etanol acuoso al 30% (650 ml) y se secó al vacío para dar un producto en bruto (217 g). El producto en bruto obtenido (217 g) se sometió a lavado en suspensión con un disolvente mixto de acetato de etilo (650 ml) y hexano (440 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se filtró y el sólido restante se secó al vacío para dar éster etílico del ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (207 g, rendimiento del 66% (con respecto a la Etapa 2)) en forma de un sólido de color pardo pálido.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,10 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,28 (3H, t, J = 7,0 Hz), 2,27 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,86 (1H, a), 4,23 (2H, c, J = 7,0 Hz), 4,56 (1H, a), 5,12 (1H, t, J = 4,9 Hz), 8,09 (1H, d, J = 11,1 Hz), 8,62 (1H, d, J = 7.5 Hz),. 8. 68 (1H, s)

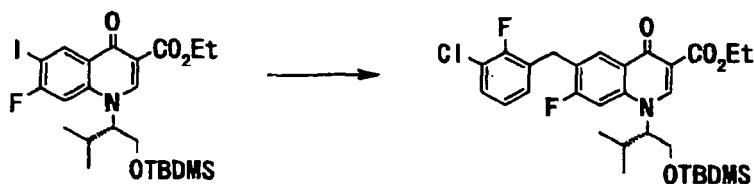
MS (ESI): M+ 448

### Etapa 4



El compuesto (150 g, 335 mmol) obtenido en la Etapa 3 se disolvió en dimetilformamida (450 ml), se añadieron imidazol (27 g, 397 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (58 g, 385 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se le añadió agua (900 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (680 ml). La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua (450 ml, 3 veces) y salmuera saturada (200 ml) y se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (192 g) de éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como una forma amorfa de color amarillo pálido.

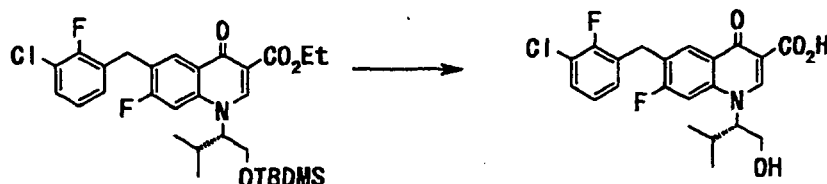
### Etapa 5



El producto en bruto (162 g) obtenido en la Etapa 4 se disolvió en tetrahidrofurano (160 ml) y, en una corriente de argón, se añadieron dibencilidenacetona paladio (II) (1,7 g, 2,9 mmol) y trifurilfosfina (1,3 g, 5,8 mmol). A esta mezcla se le añadió gota a gota a 60 °C una solución de (375 ml, 375 mmol) de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M en tetrahidrofurano obtenido de la misma manera que en el Ejemplo 1, Etapa 5 y, después de la finalización de la adición gota a gota, la mezcla se agitó con calentamiento a la misma temperatura durante 3,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron acetato de etilo (640 ml) y una solución

acuosa al 10% de ácido cítrico (400 ml), la mezcla se filtró a través de Celite, y el filtrado se repartió. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua (200 ml), hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (400 ml) y salmuera saturada (200 ml), y se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (186 g) de éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsiloximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico en forma de un aceite de color pardo.

#### Etapa 6



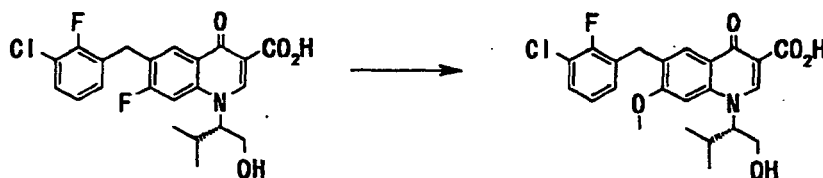
10 El producto en bruto (193 g) obtenido en la Etapa 5 se disolvió en isopropanol (650 ml), se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico (1290 ml, 1,29 mol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite. El filtrado se acidificó añadiendo ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se agitó. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar un producto en bruto (132 g) en forma de un sólido de color amarillo pálido. Los productos en bruto obtenidos de la

15 misma manera se combinaron (cantidad total de 143 g), se suspendieron en acetato de butilo (430 ml) y se sometieron a agitación en suspensión con calentamiento a reflujo durante 1 h. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y se secó al vacío para dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (99 g, rendimiento del 74% (con respecto a la Etapa 3)) en forma de un sólido de color gris.

20  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,71 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,13 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,36 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,94 (1H, a), 4,25 (2H, s), 4,77 (1H, a), 5,16 (1H, t, J = 2,4 Hz), 7,19-7,23 (1H, m), 7,32-7,35 (1H, m), 7,48-7,52 (1H, m), 8,24-8,28 (2H, m), 9,00 (1H, s), 15,00 (1H, s)

25 MS (ESI): M+ 436

#### Etapa 7



30 El compuesto (99 g, 227 mmol) obtenido en la Etapa 6 se disolvió en metanol (530 ml), se añadió una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (465 ml, 2,28 mol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 20 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se acidificó añadiendo agua (200 ml) y ácido clorhídrico concentrado (190 ml) y se extrajo con acetato de etilo (500 ml). La capa orgánica se lavó dos veces con agua (200 ml) y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (108 g). El producto en

35 bruto obtenido (108 g) se disolvió en acetato de isobutilo (330 ml) con calentamiento y la mezcla se agitó mientras se dejó enfriar durante 24 h. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar el compuesto A (71 g, rendimiento del 69%) en forma de un sólido de color blanco. Los cristales en bruto obtenidos de la misma manera se combinaron (cantidad total de 233 g), se disolvieron en acetato de isobutilo (470 ml) por calentamiento a reflujo, y la mezcla se agitó durante una noche mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración

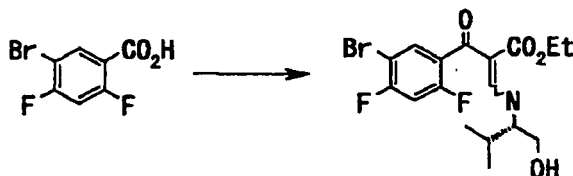
40 y se secó al vacío para dar un cristal del compuesto A (forma cristalina II) (206 g, rendimiento del 88%) en forma de un sólido de color blanco.

45  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  300 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,16 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,30-2,50 (1H, m), 3,70-3,90 (1H, m), 3,90-4,00 (1H, m), 4,03 (3H, s), 4,12 (2H, s), 4,80-4,90 (1H, m), 5,19 (1H, t), 7,19-7,25 (2H, m), 7,46-7,51 (2H, m), 8,04 (1H, s), 8,88 (1H, s), 15,44 (1H, s)

MS (ESI): M+ 448

## Ejemplo 2-2: Producción de la forma cristalina II del compuesto A

## Etapa 1



- 5 Se disolvió ácido 5-bromo-2,4-difluorobenzoico (82,7 kg, 349 mol) en tolueno (420 l), se añadieron cloruro de tionilo (62,3 kg, 523 mol) y dimetilformamida (cantidad catalítica) y la mezcla se agitó a 70 °C durante 6 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente de nuevo con tolueno (420 l). El residuo se disolvió en tolueno (220 l), esta solución se añadió gota a gota a una solución de 3,3-dimetilaminoacrilato de etilo (55,0 kg, 384 mol) y diisopropiletilamina (58,6 kg, 523 mol) en tolueno
- 10 (220 l), y la mezcla se agitó con calentamiento a 70 °C durante 21 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió (S)-(+)-valinol (36,0 kg, 349 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. A la mezcla de reacción se le añadió agua (420 l) para permitir la división, y la capa orgánica se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico 1 N (250 l, dos veces), agua (420 l), hidrogenocarbonato sódico acuoso al 5% (250 l, dos veces), agua (420 l) y salmuera al 10% (250 l). El extracto se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con dimetilformamida (420 l) para dar un residuo de concentración (330 l) que contenía un producto en bruto de éster etílico del ácido 2-(5-bromo-2,4-difluorobenzoyl)-3-((S)-1-hidroxi-2-metilpropil)acrilato.

## Etapa 2



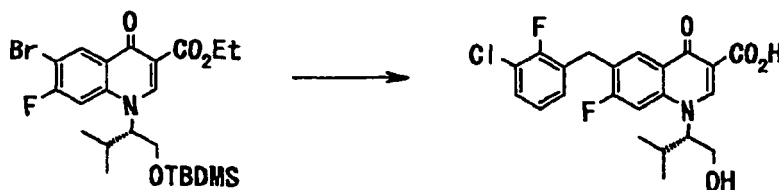
- 20 A una solución (330 l) del producto en bruto obtenido en la Etapa 1 en dimetilformamida se le añadió 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undecano (105 kg, 349 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 23 h. A la mezcla de reacción se le añadieron dimetilformamida (330 l), y después agua (170 l) y, después de agitar durante 2 h, se añadió gota a gota agua (170 l). El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó con mezcla de dimetilformamida (170 l)-agua (170 l) y después con una solución mixta de etanol (460 l)-agua (200 l). El sólido obtenido se secó al vacío, se suspendió en una mezcla de acetato de etilo (330 l)-n-heptano (330 l) y se sometió a lavado en suspensión. La suspensión se filtró y el sólido restante se secó al vacío para dar éster etílico del ácido 6-bromo-7-fluoro-1-((S)-1-hidroxi-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (102 kg, rendimiento del 73%) en forma de un sólido de color amarillo-blanco. Se confirmó que este compuesto era equivalente al producto convencional del compuesto mediante un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

## Etapa 3



- 35 El compuesto (45,0 kg, 112 mol) obtenido en la Etapa 2 e imidazol (9,95 kg, 146 mol) se suspendieron en tolueno (180 l), se añadió una solución de cloruro de terc-butildimetilsililo (17,8 kg, 118 mol) en tolueno (45 l) a 50 °C, y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 3 h. A la mezcla de reacción se le añadió tolueno (230 l) y se lavó sucesivamente con agua (450 l, dos veces) y salmuera al 20% (450 l). El extracto se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tetrahidrofurano (320 l) para dar un residuo de concentración (390 l) que contenía un producto en bruto de éster etílico del ácido 6-bromo-1-((S)-1-tert-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico.
- 40

## Etapa 4



(Preparación de una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc en tetrahidrofurano)

- 5 En una corriente de nitrógeno, se suspendió polvo de cinc (18,8 kg, 287 mol) en tetrahidrofurano (130 l), se añadió 1,2-dibromoetano (470 g, 2,50 mol) a 60 °C y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min. A esta suspensión se le añadió cloruro de trimetilsililo (560 g, 3,10 mol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó con calentamiento durante 30 min. Se añadió gota a gota una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (54,0 kg, 242 mol) en tetrahidrofurano (65 l) a 0 °C y la mezcla se agitó a 20 °C durante 3 h. El cinc restante se retiró por filtración para dar una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M en tetrahidrofurano. Ésta se usó en la siguiente etapa principal.

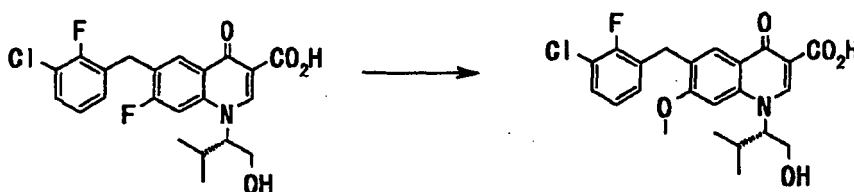
(Etapa principal)

- 15 En una corriente de nitrógeno, se disolvieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) (1,96 kg, 3,36 mol) y trifetilfosfina (1,77 kg, 6,72 mol) en tetrahidrofurano (180 l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió gota a gota una solución (390 l) del producto en bruto obtenido en la Etapa 3 en tetrahidrofurano a temperatura ambiente y se lavó con tetrahidrofurano (45 l). Se añadió gota a gota una solución (164 kg, 157 mol) del bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M que se ha mencionado anteriormente en tetrahidrofurano preparado previamente a temperatura ambiente y la mezcla se agitó con calentamiento a 55 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron tolueno (230 l) y una solución acuosa al 25% de cloruro de amonio (230 l) y la mezcla se agitó. Después de la filtración, la mezcla se repartió. La capa orgánica se lavó sucesivamente con una solución acuosa al 25% de cloruro de amonio (230 l), agua (230 l), hidrogenocarbonato sódico acuoso al 5% (230 l, 3 veces) y salmuera al 10% (230 l). El extracto se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (80 l) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico en forma de un aceite de color pardo.

## Etapa 5

- 30 El producto en bruto (80 l) obtenido en la Etapa 4 se disolvió en isopropanol (180 l), se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico (180 l, 180 mol) y la mezcla se agitó con calentamiento a 50 °C durante 9 h. A la mezcla de reacción se le añadió carbono activado (4,5 kg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, se filtró a través de polvo de celulosa y se lavó vigorosamente con una mezcla de isopropanol (45 l)-agua (45 l). Al filtrado se le añadieron agua (180 l) y n-heptano (230 l) y, después de la agitación, la mezcla se repartió. La capa acuosa se lavó de nuevo con n-heptano (230 l). A la capa orgánica se le añadieron ácido clorhídrico 4 N (45 l, 180 mol) y metil isopropil cetona (450 l) y, después de la agitación, la mezcla se repartió. La capa orgánica se lavó sucesivamente con salmuera al 10% (230 l), dos veces con hidrogenocarbonato sódico acuoso al 8,5% (230 l), ácido clorhídrico 0,5 N (230 l) y agua (230 l). El extracto se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente 3 veces con tolueno (230 l). El residuo se agitó a 100 °C durante 1,5 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, el sólido obtenido se lavó con tolueno (45 l) y se secó al vacío para dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (42,5 kg, rendimiento del 87%) en forma de un sólido de color amarillo pálido. Se confirmó que este compuesto era equivalente al producto convencional mediante el análisis por HPLC.

## Etapa 6



- 50 El compuesto (39,2 kg, 89,9 mol) obtenido en la Etapa 5 se disolvió en metanol (240 l), se añadió gota a gota una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (173 kg, 899 mol) a 10 °C y la mezcla se agitó con calentamiento a 70 °C durante 21 h. A la mezcla de reacción se le añadió carbono activado (3,9 kg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se filtró a través de polvo de celulosa y se lavó vigorosamente con metanol (80 l). Al filtrado se le añadió agua (29 kg, 1620 mol) y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se destiló

azeotrópicamente dos veces con isopropanol (240 l, 120 l). Al residuo se le añadieron salmuera al 15% (200 l) y tolueno (200 l) y, después de la agitación, la mezcla se repartió. La capa orgánica se lavó sucesivamente con salmuera al 20% (200 l, 3 veces), ácido clorhídrico 0,5 N (200 l) que contenía cloruro sódico (10 kg) y salmuera al 20% (200 l). La capa orgánica se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con acetato de etilo (200 l). Al residuo se le añadieron acetato de etilo (320 l) y agua (200 l) y, después de la agitación, la mezcla se repartió. La capa orgánica se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente dos veces con acetato de isobutilo (200 l). El residuo se disolvió por calentamiento, se filtró mientras estaba caliente y se lavó vigorosamente con acetato de isobutilo (20 l). Al filtrado se le añadió un cristal seminal (forma cristalina II del compuesto A, 39 g) a 60 °C, y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 1,5 h. La mezcla se agitó con calentamiento a 80 °C durante 2 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó adicionalmente durante 6 h. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido obtenido se lavó con acetato de isobutilo (40 l) y se secó al vacío para dar un cristal del compuesto A (forma cristalina II) (29,0 kg, rendimiento del 72%) en forma de un sólido de color blanco. Se confirmó que este cristal era equivalente al producto convencional del cristal (forma cristalina II del compuesto A obtenido en el Ejemplo 2-1) mediante el análisis por HPLC y difracción de polvo de rayos X (XRPD).

#### Ejemplo 2-3: Producción de la forma cristalina II del compuesto A

La forma cristalina II también puede producirse por cristalización de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 2-3-1 a 2-3-26.

#### Ejemplo 2-3-1

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en 1-butanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (125 mg, rendimiento del 63%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

#### Ejemplo 2-3-2

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetato de butilo (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (102 mg, rendimiento del 51%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

#### Ejemplo 2-3-3

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en metil isobutil cetona (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 6 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (168 mg, rendimiento del 84%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

#### Ejemplo 2-3-4

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en etanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (56 mg, rendimiento del 28%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

#### Ejemplo 2-3-5

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetato de etilo (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (1,6 ml) y la mezcla se agitó durante 6 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (166 mg, rendimiento del 83%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

#### Ejemplo 2-3-6

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en metil etil cetona (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (4 ml) y la mezcla se agitó durante 6 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (123 mg, rendimiento del 62%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

#### Ejemplo 2-3-7

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en 1-propanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (91 mg, rendimiento del 46%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.



Ejemplo 2-3-8

5 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en isopropanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (88 mg, rendimiento del 44%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-9

10 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en cumeno (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (188 mg, rendimiento del 94%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-10

15 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en anisol (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 17 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (107 mg, rendimiento del 54%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-11

20 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetona (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 16,5 h mientras se dejó enfriar. Se añadió más cantidad de heptano (4 ml) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 24 h. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (134 mg, rendimiento del 67%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-12

30 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en etanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (4 ml) y la mezcla se agitó durante 19 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (129 mg, rendimiento del 65%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-13

35 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en isopropanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (4 ml) y la mezcla se agitó durante 19 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (166 mg, rendimiento del 83%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

40

Ejemplo 2-3-14

45 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en 1-propanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (4 ml) y la mezcla se agitó durante 19 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (158 mg, rendimiento del 79%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-15

50 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en isobutanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (131 mg, rendimiento del 66%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-16

55 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en tolueno (2 ml) con calentamiento a 100 °C. La mezcla se agitó durante 37 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (190 mg, rendimiento del 95%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-17

60 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en metil butil cetona (2 ml) con calentamiento a 60 °C. Se añadió gota a gota heptano (1,8 ml) y la mezcla se agitó durante 37 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (191 mg, rendimiento del 96%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

65

Ejemplo 2-3-18

5 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en cloroformo (1 ml) con calentamiento a 60 °C. Se añadió gota a gota éter isopropílico (1,8 ml) y la mezcla se agitó durante 37 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (184 mg, rendimiento del 92%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-19

10 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en tetrahidrofurano (1 ml) por calentamiento a 60 °C. Se añadió gota a gota heptano éter isopropílico (2 ml) y la mezcla se agitó durante 41 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (144 mg, rendimiento del 72%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-20

15 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en isobutanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (160 mg, rendimiento del 80%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-21

25 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en butanol (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (152 mg, rendimiento del 76%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-22

30 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetato de isobutilo (2 ml) con calentamiento a reflujo. La mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (140 mg, rendimiento del 70%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-23

35 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetato de isobutilo (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II. (178 mg, rendimiento del 89%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-24

45 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetato de butilo (2 ml) con calentamiento a reflujo. Se añadió gota a gota heptano (1,5 ml) y la mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (158 mg, rendimiento del 78%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-25

50 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en anisol (2 ml) por calentamiento a 110 °C. Se añadió gota a gota heptano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 21 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (187 mg, rendimiento del 89%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-3-26

60 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en acetato de butilo (2 ml) con calentamiento a reflujo. Después de una refrigeración rápida, la mezcla se agitó durante 2 h. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (131 mg, rendimiento del 66%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 2-4: Producción de la forma cristalina II del compuesto AEtapa 1

5 Se disolvió el éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (48 g, 86 mmol) obtenido en el Ejemplo 1, Etapa 5 en metanol (300 ml), se añadieron agua (5 ml) y una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (176 ml, 862 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se neutralizó con ácido clorhídrico 6 N y el metanol se evaporó a presión reducida. A la solución obtenida se le añadió agua y, después de la

10 agitación, el sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido obtenido se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se recrystalizó en acetato de etilo-hexano para dar el compuesto A (cristal primario de 29,5 g, cristal secundario de 2,8 g, en total 32,3 g, rendimiento del 86%) en forma de un sólido de color blanco.

15 p.f. 151-152 °C

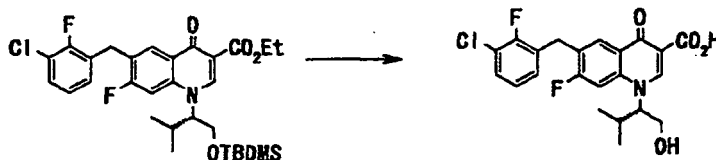
<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,16 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,30-2,50 (1H, m), 3,70-3,90 (1H, m), 3,90-4,00 (1H, m), 4,03 (3H, s), 4,12 (2H, s), 4,80-4,90 (1H, m), 5,19 (1H, t), 7,19-7,25 (2H, m), 7,46-7,51 (2H, m), 8,04 (1H, s), 8,88 (1H, s), 15,44 (1H, s)

20

MS (ESI): M+ 448.

Etapa 2

25 El compuesto A (32,3 g) obtenido en la Etapa 1 se disolvió en acetato de butilo (160 ml) con calentamiento a reflujo. La forma cristalina II del Ejemplo 2 se pipeteó a 63 °C y la mezcla se agitó durante 3 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar el cristal del compuesto A (forma cristalina II) (24,79 g, rendimiento del 77%) en forma de un sólido de color blanco.

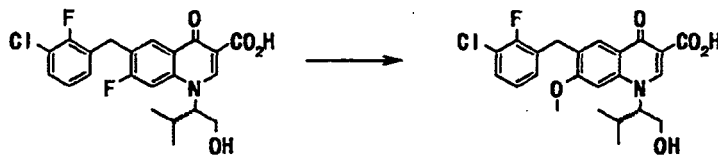
Ejemplo 2-5: Producción de la forma cristalina II del compuesto AEtapa 1

35 Se disolvió el éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (19 g, 33 mmol) obtenido en el Ejemplo 1, Etapa 5 en isopropanol (100 ml), se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico (200 ml, 200 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se filtró a través de Celite. El filtrado se acidificó añadiendo ácido clorhídrico concentrado y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (12 g, rendimiento del 82%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

40

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 400 MHz) (δ) ppm: 0,71 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,13 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,36 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,94 (1H, a), 4,25 (2H, s), 4,77 (1H, a), 5,16 (1H, t, J = 2,4 Hz), 7,19-7,23 (1H, m), 7,32-7,35 (1H, m), 7,48-7,52 (1H, m), 8,24-8,28 (2H, m), 9,00 (1H, s), 15,00 (1H, s).

45

Etapa 2

50 El compuesto (12 g, 27 mmol) obtenido en la Etapa 1 se disolvió en metanol (64 ml), se añadió una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (52 ml, 256 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se acidificó añadiendo agua (360 ml) y ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua y salmuera saturada y se secó sobre sulfato sódico. La

mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (13 g) en forma de un aceite de color pardo. El producto en bruto obtenido (13 g) se disolvió en acetato de isobutilo (60 ml) por calentamiento y, después de la siembra, la mezcla se agitó durante 23 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar el compuesto A (9,2 g, rendimiento del 75%) en forma de un sólido de color blanco.

$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  300 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,16 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,30-2,50 (1H, m), 3,70-3,90 (1H, m), 3,90-4,00 (1H, m), 4,03 (3H, s), 4,12 (2H, s), 4,80-4,90 (1H, m), 5,19 (1H, t), 7,19-7,25 (2H, m), 7,46-7,51 (2H, m), 8,04 (1H, s), 8,88 (1H, s), 15,44 (1H, s)

MS (ESI): M+ 448

### Etapa 3



El éster etílico del ácido 2-(2,4-difluoro-5-yodobenzoil)-3-dimetilaminoacrílico (20 g) obtenido en el Ejemplo 1, Etapa 2 se sometió a lavado en suspensión con un disolvente mixto de acetato de etilo (60 ml) y hexano (40 ml) y se calentó a reflujo. La mezcla se filtró, y el sólido restante se secó al vacío para dar éster etílico del ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (18 g, rendimiento del 94%) en forma de un sólido de color beige.

$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  300 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,10 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,28 (3H, t, J = 7,0 Hz), 2,27 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,86 (1H, a), 4,23 (2H, c, J = 7,0 Hz), 4,56 (1H, a), 5,12 (1H, t, J = 4,9 Hz), 8,09 (1H, d, J = 11,1 Hz), 8,62 (1H, d, J = 7,5 Hz), 8,68 (1H, s)

MS (ESI): M+ 448

### Etapa 4

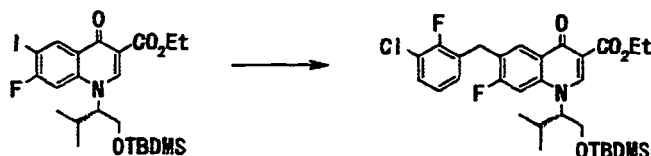


El compuesto (19 g, 42 mmol) obtenido en la Etapa 3 se disolvió en dimetilformamida (65 ml), se añadieron imidazol (3,4 g, 49,9 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (7,2 g, 47,8 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. A la mezcla de reacción se le añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato sódico. La capa orgánica se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (24 g) de éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como una forma amorfa de color beige.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: -0,07 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,77 (9H, S), 0,84 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,18 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,40 (3H, t, J = 7,2 Hz), 2,35-2,50 (1H, m), 3,85-3,95 (1H, m), 3,98-4,10 (2H, m), 4,30-4,40 (2H, m), 7,26 (1H, s), 8,64 (1H, s), 8,94 (1H, d, J = 7,2 Hz)

MS (ESI): M+ 562

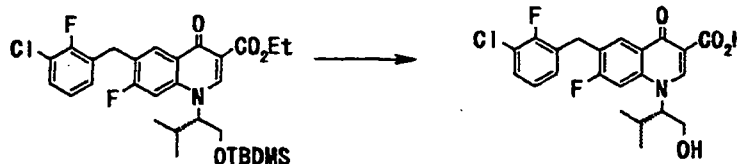
### Etapa 5



El producto en bruto (24 g) obtenido en la Etapa 4 se disolvió en tetrahidrofurano (200 ml) y, en una corriente de argón, se añadieron dibencilidienacetona paladio (II) (984 mg, 1,7 mmol) y trifurilfosfina (795 mg, 3,4 mmol), y se añadió gota a gota una solución (56 ml, 56 mmol) de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M obtenida de la misma manera que en el Ejemplo 1, Etapa 5 en tetrahidrofurano a 60 °C. Después de la finalización de la adición gota a gota, la mezcla se agitó con calentamiento a la misma temperatura durante 2 h. La mezcla de reacción se dejó

enfriar a temperatura ambiente, se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, se filtró a través de Celite y el filtrado se extrajo dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y salmuera saturada y se secó sobre sulfato de magnesio. La capa orgánica se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (30 g) de éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico en forma de una pasta de color pardo.

#### Etapa 6



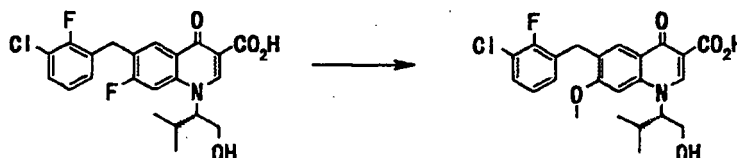
10 El producto en bruto (30 g) obtenido en la Etapa 5 se disolvió en isopropanol (150 ml), se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico (300 ml, 300 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se filtró a través de Celite. El filtrado se acidificó añadiendo ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar un producto en bruto (18 g) en forma de un sólido de color beige.

15 El producto en bruto obtenido (18 g) se suspendió en acetato de butilo (90 ml) y se sometió a agitación en suspensión con calentamiento a reflujo durante 1 h. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y se secó al vacío para dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (11 g, rendimiento del 62% (con respecto a la Etapa 3)) en forma de un sólido de color blanco.

20  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,71 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,13 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,36 (1H, a), 3,77(1H, a), 3,94 (1H, a), 4,25 (2H, s), 4,77 (1H, a), 5,16 (1H,t, J = 2,4 Hz), 7,19-7,23 (1H, m), 7,32-7,35 (1H, m), 7,48-7,52(1H, m), 8,24-8,28 (2H, m), 9,00 (1H, s), 15,00 (1H, s)

25 MS (ESI): M+ 436

#### Etapa 7



30 El compuesto (11 g, 26 mmol) obtenido en la Etapa 6 se disolvió en metanol (60 ml), se añadió una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (52 ml, 256 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró a través de Celite, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se acidificó añadiendo agua (330 ml) y ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua y salmuera saturada y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (12 g) en forma de un aceite de color pardo.

35 El producto en bruto obtenido (12 g) se disolvió en acetato de isobutilo (60 ml) por calentamiento a reflujo. Un cristal seminal (forma cristalina II del compuesto A) se pipeteó, y la mezcla se agitó durante 23 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar el compuesto A (8,2 g, rendimiento del 71%) en forma de un sólido de color blanco.

40  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$  300 MHz) ( $\delta$ ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,16 (3H, d, J = 6,5 Hz), 2,30-2,50 (1H, m), 3,70-3,90 (1H, m), 3,90-4,00 (1H, m), 4,03 (3H, s), 4,12 (2H, s), 4,80-4,90 (1H, m), 5,19 (1H, t), 7,19-7,25 (2H, m), 7,46-7,51 (2H, m), 8,04(1H, s), 8,88 (1H, s), 15,44 (1H, s)

45 MS (ESI): M+ 448

#### Etapa 8

50 El compuesto A (7,66 g) obtenido en la Etapa 7 y el compuesto A (9,17 g) obtenido en la Etapa 2 se disolvieron en acetato de isobutilo (84 ml) por calentamiento a reflujo y la mezcla se agitó durante 16 h mientras se dejó enfriar. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar la forma cristalina II (14,73 g, rendimiento del 88%) del compuesto A en forma de un sólido de color blanco.

## Ejemplo 2-6: Producción de la forma cristalina II del compuesto A

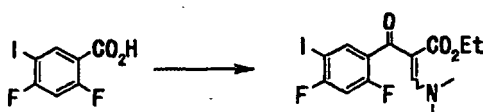
## Etapa 1



- 5 Se disolvió ácido 2,4-difluorobenzoico (100 g, 633 mmol) en ácido trifluorometanosulfónico (400 ml) y se añadió en porciones N-yodosuccinimida (157 g, 696 mmol) a no más de 5 °C. Después de la finalización de la adición, la mezcla se agitó a 50 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se vertió en agua enfriada con hielo y la mezcla se agitó durante 1 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó sucesivamente con agua y hexano y se secó al vacío para dar ácido 2,4-difluoro-5-yodobenzoico (179 g de rendimiento cuantitativo) en forma de un sólido de color blanco.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) (σ) ppm: 6,94 (1H, dd, J = 10,3, 10,3 Hz), 8,46 (1H, d, J = 7,5 Hz)

## Etapa 2



- 15 El compuesto (28 g, 100 mmol) obtenido en la Etapa 1 se disolvió en acetato de etilo (300 ml), se añadieron cloruro de oxalilo (11 ml, 122 mmol) y dimetilformamida (cantidad catalítica), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El filtrado se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tolueno. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (100 ml), esta solución se añadió gota a gota a una solución de 3,3-dimetilaminoacrilato de etilo (17 g, 120 mmol) y trietilamina (21 ml, 150 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml), y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se añadió acetato de etilo (200 ml). La mezcla se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y salmuera saturada y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a agitación en suspensión con un disolvente mixto de éter dietílico (50 ml) y hexano (50 ml). La mezcla se filtró y el sólido restante se secó al vacío para dar un producto en bruto (26 g, rendimiento del 63%) de éster etílico del ácido 2-(2,4-difluoro-5-yodobenzoyl)-3-dimetilaminoacrilico en forma de un sólido de color amarillo.

## Etapa 3



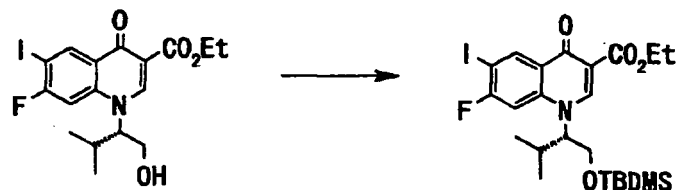
- 30 El producto en bruto (22 g, 55 mmol) obtenido en la Etapa 2 se disolvió en tetrahidrofurano (110 ml), se añadió (S)-(+)-valinol (6,8 g, 65,8 mmol) y la mezcla se agitó con calentamiento a 50 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml), se lavó sucesivamente con agua y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de magnesio. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en dimetilformamida (80 ml), se añadió carbonato potásico (19 g, 137 mmol) y la mezcla se agitó con calentamiento a 60 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Al residuo obtenido se le añadió agua (250 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido obtenido se lavó sucesivamente con un disolvente mixto de agua (100 ml), acetato de etilo (10 ml) y hexano (40 ml) y se secó al vacío para dar éster etílico del ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroxi-2-metilpropil)-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (22 g, rendimiento del 88%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,10 (3H, d, J = 6,6 Hz), 1,28 (3H, t, J = 7,0 Hz), 2,27 (1H, a), 3,77 (1H, a), 3,86 (1H, a), 4,23 (2H, c, J = 7,0 Hz), 4,56 (1H, a), 5,12 (1H, t, J = 4,9 Hz), 8,09 (1H, d, J = 11,1 Hz), 8,62 (1H, d, J = 7,5 Hz), 8,68 (1H, s).

45

MS (ESI): M+ 448

## Etapa 4

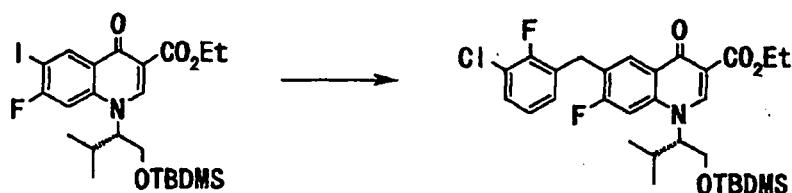


5 El compuesto (22 g, 48 mmol) obtenido en la Etapa 3 se disolvió en dimetilformamida (60 ml), se añadieron imidazol (3,9 g, 57,7 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (8,0 g, 53,0 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo obtenido se disolvió en acetato de etilo (200 ml), se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 3:7 a 4:6) para dar éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-yodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (25 g, rendimiento del 92%) en forma de una cera de color blanco.

15  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: -0,07 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,77 (9H, s), 0,84 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,18 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,40 (3H, t, J = 7,2 Hz), 2,35-2,50 (1H, m), 3,85-3,95 (1H, m), 3,98-4,10 (2H, m), 4,30-4,40 (2H, m), 7,26 (1H, s), 8,64 (1H, s), 8,94 (1H, d, J = 7,2 Hz)

MS (ESI): M+ 562

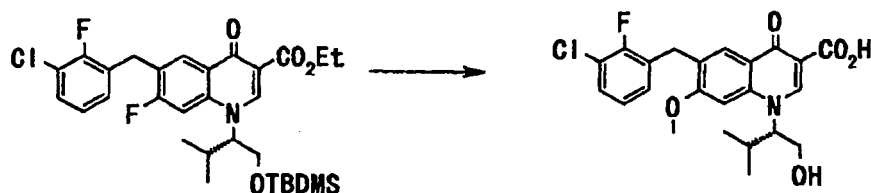
## Etapa 5



20 El compuesto (25 g, 44 mmol) obtenido en la Etapa 4 se disolvió en tetrahydrofurano (200 ml) y, en una corriente de argón, se añadieron dibencilidienacetona-paladio (II) (1,0 g, 1,8 mmol) y trifurilfosfina (824 mg, 3,5 mmol). Se añadió gota a gota una solución (58 ml, 58 mmol) de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilcinc 1 M obtenida de la misma manera que en el Ejemplo 1, Etapa 5 en tetrahydrofurano a 60 °C. Después de la finalización de la adición gota a gota, la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió acetato de etilo (200 ml), se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico 1 N, agua, hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado, agua y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 4:6 a 1:1) para dar éster etílico del ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (17 g, rendimiento del 68%) en forma de un aceite de color amarillo pálido.

35  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ( $\delta$ ) ppm: -0,09 (3H, s), -0,05 (3H, s), 0,75 (9H, s), 0,85 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,18 (3H, d, 6,7 Hz), 1,39 (3H, t, J = 7,1 Hz), 2,45 (1H, a), 3,89-3,92 (1H, m), 3,98-4,02 (1H, m), 4,07-4,12 (1H, m), 4,12 (2H, s), 4,34-4,41 (2H, m), 6,96-7,00 (1H, m), 7,03-7,05 (1H, m), 7,21-7,24 (1H, m), 7,26-7,29 (1H, m), 8,39 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,63 (1H, s)

## Etapa 6



40 El compuesto (17 g, 30 mmol) obtenido en la Etapa 5 se disolvió en metanol (120 ml), se añadió una solución al 28% de metóxido sódico y metanol (62 ml, 304 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 19 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió agua (200 ml), y el metanol se evaporó a presión reducida. El residuo se acidificó añadiendo ácido clorhídrico concentrado, se extrajo con acetato de etilo y se secó

sobre sulfato sódico. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto (14 g) del compuesto A en forma de un aceite de color amarillo pálido.

#### Etapa 7

5 El compuesto A (14,11 g) obtenido en la Etapa 6 se suspendió en un disolvente mixto de acetato de etilo (20 ml) y hexano (20 ml) a temperatura ambiente, un cristal seminal (forma cristalina II del compuesto A) se pipeteó, y la mezcla se agitó durante 1 h. La suspensión se filtró y el sólido restante se secó al vacío para dar el compuesto A (forma cristalina II, 10,40 g, rendimiento del 77%) en forma de un sólido de color blanco.

10

#### Ejemplo 3: Producción de la forma cristalina III del compuesto A

##### Ejemplo 3-1: Producción de la forma cristalina III del compuesto A

15 La forma cristalina II del compuesto A (10,0 g, 22,3 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 se añadió a acetato de isobutilo (30 ml) y el cristal se disolvió por calentamiento a reflujo. La solución se enfrió a 90 °C y se agitó durante 5 h para permitir la precipitación de cristales. Esta solución se dejó enfriar adicionalmente a temperatura ambiente y se agitó durante 12 h más. El cristal precipitado se recogió por filtración. El cristal obtenido se lavó con acetato de isobutilo (10 ml) y se secó al vacío para dar un cristal de color blanco (9,85 g, rendimiento del 98,5%). Ya que se confirmó que este cristal era diferente de la forma cristalina II mediante análisis por XRPD, se tomó un cristal que muestra el gráfico de XRPD (figura 1) como este cristal como la forma cristalina III.

20

##### Ejemplo 3-2: Producción de la forma cristalina III del compuesto A

25 La forma cristalina II del compuesto A (250 g, 558 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 se añadió a acetato de isobutilo (750 ml). Se añadió un cristal seminal (12,5 g) de la forma cristalina III del compuesto A obtenido en el Ejemplo 3 a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 17 h. El cristal precipitado se recogió por filtración. El cristal obtenido se lavó con acetato de isobutilo (250 ml) y se secó al vacío para dar el producto objeto (forma cristalina III, 259 g, rendimiento del 98,6%) en forma de un cristal de color blanco. Se confirmó que este cristal era equivalente al producto convencional del cristal (forma cristalina III del compuesto A obtenido en el Ejemplo 3-1) mediante análisis por XRPD.

30

##### Ejemplo 3-3: Producción de la forma cristalina III del compuesto A

35 El compuesto A (forma cristalina II, 10,0 g, 22,3 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 se añadió a isopropanol (30 ml) y la mezcla se calentó a reflujo para disolver el cristal. La solución se enfrió a 70 °C, se añadió un cristal seminal (10 mg) de la forma cristalina III del compuesto A obtenido en el Ejemplo 3-1, y la mezcla se agitó durante 5 h. Esta mezcla se dejó enfriar adicionalmente a temperatura ambiente, se agitó durante 12 h, y el cristal se recogió por filtración. El cristal obtenido se lavó con isopropanol (10 ml) y se secó al vacío para dar el producto objeto (forma cristalina III, 9,72 g, rendimiento del 97,2%) en forma de un cristal de color blanco. Se confirmó que el cristal era equivalente al producto convencional del cristal (forma cristalina III del compuesto A obtenido en el Ejemplo 3-1) mediante análisis por XRPD.

40

##### Ejemplo 3-4: Producción de la forma cristalina III del compuesto A

45 La forma cristalina II del compuesto A (7,00 g, 15,6 mmol) obtenida en el Ejemplo 2-2 se añadió a una solución mixta de etanol (52,5 ml) y agua (7 ml) y se disolvió por calentamiento. Se añadió agua (28 ml), se añadió un cristal seminal (10 mg) del producto objeto a 70 °C y la mezcla se agitó durante 4 h. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se enfrió con hielo, se agitó durante 2 h más, y los cristales se recogieron por filtración. Los cristales obtenidos se lavaron con una solución mixta de etanol frío (8,4 ml) y agua (5,6 ml) y se secaron al vacío para dar el producto objeto en forma de cristales de color blanco (forma cristalina III, 6,77 g, rendimiento del 96,8%). Se confirmó que este cristal era equivalente al producto convencional (Ejemplo 3-1) mediante análisis por XRPD.

50

#### **Ejemplo experimental**

55 Los valores de propiedad de cada forma cristalina se determinaron por las siguientes pruebas de análisis, y la prueba de estabilidad de cada forma cristalina se realizó usándolos como índices.

#### Muestra

60

A menos que se especifique otra cosa, el cristal que se ha mencionado anteriormente (forma cristalina I) obtenido en el Ejemplo de Referencia 1, el cristal (forma cristalina II) obtenido en el Ejemplo 1 y el cristal (forma cristalina III) obtenido en el Ejemplo 3-1 se usaron como muestras.

65

#### Prueba de análisis



## 1. Difractometría de polvo de rayos X

Esta prueba tiene como objetivo obtener los patrones de difracción de polvo de rayos X para especificar la forma cristalina de los cristales obtenidos en el Ejemplo de Referencia 1, el Ejemplo 1 y el Ejemplo 3-1. Los patrones de difracción se utilizan para especificar la forma del cristal, evaluar la estabilidad, con el fin de determinar la pureza y similar.

Se fijó una muestra a una celda de aluminio, y la medición se realizó usando un difractómetro de polvo de rayos X (RINT 2000/PC Ultima<sup>+</sup>, fabricado por Rigaku Corporation, fuente de rayos X: rayo Cu-K $\alpha$ 1, tensión del tubo: 40 kV, corriente eléctrica del tubo: 40 mA, velocidad de barrido: 5° por min, ancho de paso: 0,02°, ángulo de difracción: 5-40°), en base a lo cual se obtuvieron los patrones de difracción. Los patrones de difracción obtenidos se muestran en la figura 1.

Como se muestra en la figura 1, los patrones de difracción de polvo de rayos X obtenidos a partir de las muestras respectivas fueron diferentes.

Por lo tanto, se confirma que los cristales obtenidos en el Ejemplo de Referencia 1, el Ejemplo 1 y el Ejemplo 3-1 eran distintos entre sí, y muestran patrones de difracción característicos como se muestra en el patrón de difracción de polvo de rayos X. Por lo tanto, en la presente memoria descriptiva, se nombran como forma cristalina I, forma cristalina II y forma cristalina III, en base a estos patrones de difracción de polvo de rayos X.

Para la especificación de la forma cristalina, la característica del pico de difracción de cada cristal puede evaluarse de una manera extensa en base al gráfico de difracción de la figura 1.

A continuación, se muestran los picos de difracción principales y los picos de difracción característicos especificados de los patrones de difracción de la figura 1.

### [Forma cristalina I]

Pico de difracción principal:  $2\theta = 6,58; 14,40; 14,64; 15,24; 16,48; 19,16; 20,90; 21,14; 22,24; 24,74; 25,64; 26,12; 27,20^\circ$ ;  
Pico de difracción característico:  $2\theta = 6,58; 14,40; 19,16; 20,90; 21,14^\circ$ ;

### [Forma cristalina II]

Pico de difracción principal:  $2\theta = 6,56; 9,04; 13,20; 14,62; 15,24; 16,48; 19,86; 20,84; 21,22; 22,24; 25,22; 25,96; 26,12; 27,34^\circ$ ;  
Pico de difracción característico:  $2\theta = 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22^\circ$ ;

### [Forma cristalina III]

Pico de difracción principal:  $2\theta = 8,54; 14,02; 15,68; 15,90; 16,00; 17,06; 17,24; 17,84; 18,12; 19,50; 19,90; 22,26; 22,68; 23,02; 24,16; 24,76; 25,18; 25,74; 25,98; 27,50; 28,80; 30,38; 30,72; 32,54^\circ$ ;  
Pico de difracción característico:  $2\theta = 8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74^\circ$ ;

## 2. Análisis térmico

Esta prueba tiene como objetivo la medición de la entalpía y la temperatura de inicio extrapolada en un pico endotérmico en la curva de medición por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Estos valores están entre los índices de estabilidad de la forma cristalina I, la forma cristalina II y la forma cristalina III que se han mencionado anteriormente, y pueden usarse como un índice para especificar la forma del cristal.

### 2.1. Entalpía y temperatura de inicio extrapolada de la forma cristalina I y la forma cristalina II

La forma cristalina I y la forma cristalina II se sometieron a medición usando un aparato de medición de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (DSC8240, fabricado por Rigaku Corporation), en atmósfera, muestra de medición  $5 \pm 1$  mg, proporción de elevación de temperatura: 10 °C/min, cacerola de aluminio abierta, y óxido de alúmina como referencia. Se determinaron la entalpía y la temperatura de inicio extrapolada en un pico endotérmico en la curva de DSC.

### 2.2. Entalpía y temperatura de inicio extrapolada de la forma cristalina III

La forma cristalina III se sometió a medición usando un aparato de medición de DSC (DSC8240, fabricado por Rigaku Corporation), en atmósfera, medida de muestra  $5,0 \pm 0,5$  mg, proporción de elevación de temperatura: 5 °C/min, cacerola cerrada de aluminio, y óxido de alúmina como referencia. Se determinaron la entalpía y la temperatura de inicio extrapolada en un pico endotérmico de la curva DSC.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Curva DSC en el pico endotérmico en entalpía y temperatura de inicio extrapolada

Forma cristalina	Pico endotérmico	
	Entalpía (J/g)	Temperatura de inicio extrapolada (°C)
Forma cristalina I	51,080	150,3
Forma cristalina II	53,542	151,2
Forma cristalina III	81,404	162,1

5 Como se muestra en la Tabla 1, la forma cristalina III muestra la mayor entalpía y la temperatura de inicio extrapolada más elevada entre las tres formas cristalinas. Así, se confirmó que la forma cristalina III era la forma más estable.

### 10 3. Prueba de pureza

Esta prueba tiene como objetivo la medición de la pureza del compuesto A. La pureza puede usarse como índice de la estabilidad química.

#### 15 3.1. Pureza del compuesto de la forma cristalina I y la forma cristalina II

Cada muestra (forma cristalina I y forma cristalina II, aprox. 10 mg) se disolvió en acetonitrilo para preparar una cantidad de 10 ml y se usó como solución de muestra. Esta solución (10 µl) se aplicó a cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en las siguientes condiciones. El área máxima de cada solución de muestra se midió por integración automática, y la pureza se determinó por la fórmula siguiente. La pureza se muestra en las Tablas 5 y 6 que se muestran a continuación.

$$\text{Pureza (\%)} = 100 - (A_{\text{sum}}/A_s) \times 100$$

25  $A_s$ : área total máxima de picos obtenidos de la solución de muestra.

$A_{\text{sum}}$ : área máxima total de picos distintos del pico principal obtenido de la solución de muestra.

#### Condiciones de la prueba

30 Detector: medidor de absorción de UV (longitud de onda: 259 nm)

Columna: CAPCELL PAK MG (diámetro interno 4,6 cm, longitud 15 cm, tamaño de partícula 5 µm, fabricado por Shiseido Co., Ltd.

Temperatura de la columna: temperatura constante alrededor de 40 °C

Fase móvil A: solución de ácido trifluoroacético (1:1000)

35 Fase móvil B: solución de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (1:1000)

Programa de gradiente: Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, la proporción de mezcla de fase móvil A y fase móvil B cambia para controlar el gradiente de concentración.

Tabla 2

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	55	45
0-5	55 → 52	45 → 48
5-15	52	48
15-25	52 → 20	48 → 80
25-35	20	80
35-36	20 → 55	80 → 45
36-45	55	45

Caudal: 1 ml/min

40

#### 3.2. Pureza del compuesto de la forma cristalina III

Una muestra (forma cristalina III, aprox. 50 mg) se disolvió en una mezcla (4:1) de fase móvil B y fase móvil A para preparar una cantidad de 50 ml, que se usó como una solución de muestra. Esta solución (1 ml) se midió precisamente y se añadió una mezcla (4:1) de la fase móvil B y la fase móvil A para preparar precisamente una cantidad de 100 ml, que se usó como una solución normal. La solución de muestra y la solución normal (15 µl) se aplicaron a la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en las condiciones siguientes. El área máxima de cada solución se midió por integración automática, y la pureza se determinó por la fórmula siguiente. La pureza se muestra en la Tabla 7 que se muestra a continuación.

50

$$\text{Pureza (\%)} = 100 - (A_{\text{sum}}/A_r)$$

A<sub>r</sub>: área máxima de cresta principal obtenida de la solución normal.

A<sub>sum</sub>: área máxima total de picos distintos del pico principal obtenido de la solución de muestra.

5 Condiciones de la prueba

Detector: medidor de absorción de UV (longitud de onda de medición: 259 nm).

Columna: Waters Xterra MC C18 (diámetro interno 4,6 cm, longitud 5 cm, diámetro de partículas 2,5 µm, fabricado por Waters).

10 Temperatura de la columna: temperatura constante aprox. 40 °C.

Fase móvil A: se añade ácido fosfórico a una solución de fosfato ácido dipotásico (1 → 1149) para ajustar el pH a 7,0.

Fase móvil B: acetonitrilo.

15 Programa de gradiente: Como se muestra en la Tabla 3 que se muestra a continuación, la proporción de la mezcla de fase móvil A y la fase móvil B cambia para controlar el gradiente de concentración.

Tabla 3

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0-15	58	42
15-35	58 → 20	42 → 80
35-45	20	80
45-46	20 → 58	80 → 42
46-55	58	42

Caudal: 0,9 ml/min

4. Prueba de solubilidad

20

Esta prueba tiene como objetivo la medición de la solubilidad del cristal en las diversas soluciones de prueba y en diversos pH. La solubilidad es uno de los índices de la estabilidad de la forma cristalina I, la forma cristalina II y la forma cristalina III que se han mencionado anteriormente y también puede usarse como índice de referencia de la capacidad de absorción de la forma cristalina por los organismos vivos.

25

Cada muestra (forma cristalina I, forma cristalina II y forma cristalina III, aprox. 10 mg) se puso en un tubo centrífugo de 10 ml junto con la siguiente solución de prueba (5 ml) y se agitó con un agitador (SR-1M; fabricado por Tietech Co., Ltd.) por 14 h. Después de la agitación, la mezcla se centrifugó (3000 rpm, 20 min) y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de disco de politetrafluoroetileno de 0,2 µm de tamaño de poro-13 mm de diámetro (Millex-LG; fabricado por Millipore Corporation). La medición se realizó por la cromatografía líquida de rendimiento elevado (HPLC). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

30

Tabla 4 Prueba de solubilidad

Solución de prueba	pH	Solubilidad (µg/ml)	
		Forma cristalina II	Forma cristalina III
Agua purificada	-	0,5	<0,1
Farmacopea Japonesa 1 <sup>er</sup> fluido <sup>1)</sup>	1,2	0,9	<0,1
Farmacopea Japonesa 2 <sup>o</sup> fluido <sup>2)</sup>	6,8	5,8	2,4
McIlvaine <sup>3)</sup>	2,2	1,9	<0,1
	4	0,8	<0,1
	5	0,4	<0,1
	6	1,0	0,7
	6,8	6,3	0,7
	8	84	23

35 <sup>1)</sup> Farmacopea Japonesa, Método de prueba general, Método de Prueba de desintegración, 1<sup>er</sup> fluido. Se añaden ácido clorhídrico (7,0 ml) y agua al cloruro sódico (2,0 g) para preparar una cantidad de 1000 ml. Esta solución es transparente e incolora y tiene un pH de aproximadamente 1,2.

40 <sup>2)</sup> Farmacopea japonesa, Método de prueba general, Método de Prueba de desintegración, 2<sup>o</sup> fluido. Se añaden 0,2 mol/l de una muestra de hidróxido sódico (118 ml) y 0,2 mol/l de agua a una muestra de fosfato potásico disódico (250 ml) para preparar una cantidad de 1000 ml. Esta solución es transparente e incolora y tiene un pH de aproximadamente 6,8.

<sup>3)</sup> Tampón McIlvaine obtenido mezclando hidrogenofosfato disódico y ácido cítrico en una proporción determinada para el ajuste a un pH determinado.

45

A partir de los resultados que se han mencionado anteriormente, se confirmó que la forma cristalina II tiene una

solubilidad más alta que la forma cristalina III.

#### 5. Prueba de estabilidad

- 5 Se realizó una prueba de estabilidad de cada muestra en las siguientes condiciones de conservación. Los resultados de la forma cristalina I se muestran en la Tabla 5, los resultados de la forma cristalina II se muestran en la Tabla 6, y los resultados de la forma cristalina III se muestran en la Tabla 7.

- 10 Como se muestra en la Tabla 6 y la Tabla 7, la forma cristalina II y la forma cristalina III no mostraron ninguna diferencia en los resultados prueba en todas las condiciones de conservación, en comparación a la muestra inicial. Por el contrario, como se muestra en la Tabla 5, la forma cristalina I mostró cambios en el patrón de difracción de polvo de rayos X obtenido de la muestra después de la conservación en las condiciones de conservación N° 3 (80 °C, conservación en recipiente abierto durante 3 días) y condiciones de conservación N° 5 (60 °C, conservación en un recipiente abierto durante 3 semanas), y se observó que el patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma cristalina I se solapó con el patrón de difracción de polvo de rayos X obtenido a partir de la forma cristalina II. Por lo tanto, se evaluó que una parte de la muestra mostraba una transición de cristal con respecto a la forma cristalina II durante la conservación. Los patrones de difracción de polvo de rayos X de la muestra de conservación de muestras en las condiciones de conservación N° 1-6 de la forma cristalina I se muestran en la figura 2.

20

Tabla 5  
Resultados de la prueba de estabilidad de la forma cristalina I

Condiciones de conservación	Aspecto	Pureza	XRD	Análisis térmico
1 Inicial	-	99,1%	Patrón de difracción de la forma cristalina I	Pico endotérmico (temperatura de inicio extrapolada 150,3 °C)
2 80 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 días	Sin cambio en el aspecto	99,1%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC
3 80 °C Recipiente abierto Conservado durante 3 días	Sin cambio en el aspecto	99,1%	Solapamiento de los patrones de difracción de la forma cristalina I y la forma cristalina II	Sin cambio en la curva DSC
4 60 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	99,1%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC
5 60 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	99,1%	Solapamiento de los patrones de difracción de la forma cristalina I y la forma cristalina II	Sin cambio en la curva DSC
6 60 °C/H.R. al 75% Recipiente abierto Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	99,1%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC

H.R.: humedad relativa

XRD: difracción de polvo de rayos X

Tabla 6  
Resultados de la prueba de estabilidad de la forma cristalina II

Condiciones de conservación	Aspecto	Pureza	XRD	Análisis térmico
1 Inicial	-	98,9%	Patrón de difracción de la forma cristalina II	Pico endotérmico (temperatura de inicio extrapolada 151,2 °C)
2 80 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 días	Sin cambio en el aspecto	98,9%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC
3 80 °C Recipiente abierto Conservado durante 3 días	Sin cambio en el aspecto	98,8%	Solapamiento de los patrones de difracción de la forma cristalina I y la forma cristalina II	Sin cambio en la curva DSC
4 60 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	98,9%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC
5 60 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	98,8%	Solapamiento de los patrones de difracción de la forma cristalina I y la forma cristalina II	Sin cambio en la curva DSC
6 60 °C/H.R. al 75% Recipiente abierto Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	98,9%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC

H.R.: humedad relativa

XRD: difracción de polvo de rayos X

5

Tabla 7  
Resultados de la prueba de solubilidad de la forma cristalina III

Condiciones de conservación	Aspecto	Pureza	XRD	Análisis térmico
1 Inicial	-	98,71%	Patrón de difracción de la forma cristalina III	Pico endotérmico (temperatura de inicio extrapolada 162,2 °C)
2 80 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 días	Sin cambio en el aspecto	98,68%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC
3 80 °C Recipiente abierto Conservado durante 3 días	Sin cambio en el aspecto	98,69%	Solapamiento de los patrones de difracción de la forma cristalina I y la forma cristalina II	Sin cambio en la curva DSC
4 60 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	98,67%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC

5	60 °C Recipiente cerrado Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	98,66%	Solapamiento de los patrones de difracción de la forma cristalina I y la forma cristalina II	Sin cambio en la curva DSC
6	60 °C/H.R. al 75% Recipiente abierto Conservado durante 3 semanas	Sin cambio en el aspecto	98,65%	Sin cambio en el patrón de difracción	Sin cambio en la curva DSC

H.R.: humedad relativa

XRD: difracción de polvo de rayos X

De los resultados de la prueba de estabilidad que se ha mencionado anteriormente, se observó que la forma cristalina I era inestable pero la forma cristalina II y la forma cristalina III eran extremadamente estables en diversas condiciones de conservación. Por consiguiente, era evidente que son preferibles la forma cristalina II y la forma cristalina III para su uso como un producto farmacéutico y similar.

En cuanto a capacidad de absorción por los organismos vivos, es más preferible la forma cristalina II, y es más preferible la forma cristalina III porque es el cristal más estable.

Debido a que tanto la forma cristalina II como la forma cristalina III son estables, puede usarse un cristal mixto de estas para la presente invención.

### Ejemplo experimental

A continuación se explican los procedimientos de evaluación de la actividad inhibidora de la integrasa del VIH de un cristal o un cristal mixto del compuesto A de la presente invención.

(i) construcción del sistema de expresión del gen de integrasa recombinante.

La fenilalanina de la posición 185 del gen de longitud completa de la integrasa del VIH (J. Virol., 67, 425-437 (1993)) se sustituyó por histidina y se insertó en los sitios NdeI y XhoI enzimáticos de restricción del plásmido pET21a (+) (fabricado por Novagen), por lo que se construyó un vector de expresión de integrasa, pET21a-IN-F185H.

(ii) Producción y purificación de la proteína integrasa.

BL21 recombinante de *Escherichia coli* (DE3) transformada con el plásmido pET21a-IN-F185H obtenido en (i) se cultivó con agitación a 30 °C en un medio líquido que contenía ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmica, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido para promover la expresión del gen de integrasa. El cultivo prosiguió durante 3 horas para promover la acumulación de la proteína integrasa. La *E. coli* recombinante se recogió en sedimentos por separación centrífuga y se conservó a -80 °C.

La *E. coli* se suspendió en tampón de lisis (HEPES 20 mM (pH 7,5), DTT 5 mM, CHAPS 10 mM, glicerol al 10 %) que contenía cloruro de sodio 1M y se sometió a presurización y despresurización repetidas para la rotura y separación por centrifugación a 4 °C, 40.000 xg, 60 minutos para recuperar una fracción hidrosoluble (sobrenadante). Esto se diluyó 10 veces con tampón de lisis sin cloruro de sodio, se mezcló con SP-Sepharose (fabricada por Pharmacia Corporation) y se agitó a 4 °C durante 60 minutos para permitir la adsorción de la proteína integrasa a la resina. La resina se lavó con tampón de lisis que contenía cloruro de sodio 100 mM y la proteína integrasa se eluyó con tampón de lisis que contenía cloruro de sodio 1M.

La solución de la proteína integrasa eluida se aplicó a una columna Superdex 75 (Pharmacia Corporation) para la filtración en gel. La proteína se eluyó con tampón de lisis que contenía cloruro de sodio 1M.

Las fracciones obtenidas de la proteína integrasa se recogieron y se conservaron a -80 °C.

(iii) Preparación de solución de ADN

A continuación el ADN sintetizado por Greiner se disolvió en tampón TE (Tris -ácido clorhídrico 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM) y se mezcló con ADN donante, ADN diana y cada cadena complementaria (cadena + y -) a 1 μM. La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos, a 80 °C durante 10 minutos, a 70 °C durante 10 minutos, a 60 °C durante 10 minutos, a 50 °C durante 10 minutos y a 40 °C durante 10 minutos y se conservó a 25 °C para

proporcionar un ADN bicatenario que se usó para el ensayo.

ADN Donante (cadena - que posee biotina unida al extremo 5')

Cadena + donante: 5'-Biotina-ACC CTT TTA GTC AGT GTG GAA AAT CTC TAG CA-3' (SEQ ID NO: 1)

Cadena - Donante: 5'-ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA AAA G-3' (SEQ ID NO: 2)

5 ADN diana (ambas cadenas +, - presentan digoxigenina añadida al extremo 3')

Cadena + diana: 5'-TGA CCA AGG GCT AAT TCA CT-Dig-3' (SEQ ID NO: 3)

Cadena - diana: 5'-AGT GAA TTA GCC CTT GGT CA-Dig-3' (SEQ ID NO: 4)

(iv) Determinación de la actividad inhibidora enzimática (integrasa del VIH)

10 El ADN donante se diluyó con el tampón TE a 10 nM, de los cuales 50 µl se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (fabricada por Roche) y se dejó adsorber a 37 °C durante 60 minutos. Después, el ADN se lavó con tampón fosfato (PBS Dulbecco, Sanko Junyaku Co., Ltd.) que contenía Tween 20 y tampón fosfato al 0,1 %. Después, a cada pocillo, se añadió una mezcla de reacción (70 µl, para la composición véase el \* indicado más adelante), una sustancia de ensayo (10 µl) diluida con la mezcla de reacción y  
15 100 µg/ml de proteína integrasa (10 µl) y reaccionó a 37 °C durante 60 minutos.

Después, se añadió ADN diana 50 nM (10 µl), reaccionó a 37 °C durante 10 minutos y se lavó con tampón fosfato que contenía Tween 20 al 0,1 % para detener la reacción.

20 Después, se añadió una solución de anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa 100 mU/ml (fabricado por Roche, 100 µl) y la mezcla reaccionó a 37 °C durante 60 minutos, seguido de lavado con tampón fosfato que contenía Tween 20 al 0,1 %.

25 Se añadió una solución de color de peroxidasa (fabricada por Bio Rad, 100 µl) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 minutos. La reacción del color se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 1N (100 µl). Se midió la absorbancia a 450 nm.

La actividad inhibidora de la integrasa del VIH (IC<sub>50</sub>) del compuesto A de la presente invención se calculó a partir de la tasa de inhibición de acuerdo con la siguiente fórmula. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

30 Tasa de inhibición (%) =  $[1 - (\text{Objeto} - \text{Blanco}) / (\text{Control} - \text{Blanco})] \times 100$

Objeto; absorbancia del pocillo en presencia del compuesto de ensayo

Control; absorbancia del pocillo en ausencia del compuesto de ensayo

35 Blanco; absorbancia del pocillo en ausencia del compuesto de ensayo, en ausencia de la proteína integrasa.

\* Composición de la mezcla de reacción: ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditioneitol (DTT) 3 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 0,1 mg/ml, glicerol al 5 %, dimetil sulfóxido (DMSO) al 10 %, Tween 20 al 0,01 %.

40

Tabla 8

Compuesto No.	Actividad enzimática IC <sub>50</sub> (µM)
Compuesto A	0,0029

45 Evaluación de la actividad antiviral.

El efecto del uso combinado de un cristal o un cristal mixto del compuesto A de la presente invención y agentes anti-VIH existentes puede determinarse de la siguiente manera.

50 Por ejemplo, el efecto del uso combinado de dos agentes de inhibidores nucleósidos de transcriptasa inversa existentes (zidovudina, lamivudina, tenofovir), inhibidores no-nucleósidos de transcriptasa inversa (efavirenz) o inhibidores de proteasa (indinavir, nelfinavir) y un cristal o un cristal mixto del compuesto A y similares se evaluó por el procedimiento XTT usando células CEM-SS infectadas con IIB del VIH-1.

55 Además, se evaluó el efecto del uso combinado de tres agentes de un cristal o un cristal mixto del compuesto A, zidovudina y lamivudina o un cristal o un cristal mixto del compuesto A, tenofovir y lamivudina y similar.

60 Antes del ensayo del uso combinado, se midieron los valores IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de cada agente farmacéutico en solitario. Para evaluar el efecto del uso combinado de dos agentes, se combinaron 5 concentraciones del agente farmacéutico a y 9 concentraciones del agente farmacéutico b, determinadas basándose en estos resultados. Para el uso combinado de tres agentes, se mezclaron un agente farmacéutico b a alta concentración y un agente farmacéutico c y un agente farmacéutico a y la concentración se combinó para la evaluación

Los resultados del ensayo del cristal o cristal mixto del compuesto A y la combinación del fármaco en solitario o en

combinación con el mismo se analizó basándose en los programas de Prichard y Shipman MacSynergy II versión 2.01 y Deltagraph versión 1.5d.

5 Se representó una gráfica tridimensional del % de inhibición a las concentraciones de cada agente farmacéutico combinado, obtenida de realizar 3 veces los ensayos, con límites de confianza del 95 % (o 68 %, 99 %) y el efecto del uso combinado se evaluó basándose en los valores numéricos de  $\mu M^2\%$  calculados de los mismos. Los criterios de evaluación se muestran en la siguiente tabla.

Definición de interacción	$\mu M^2\%$
Acción sinérgica fuerte	>100
Acción sinérgica leve	+51 - +100
Acción aditiva	+50 - -50
Acción antagonista leve	-51 - -100
Acción antagonista fuerte	<-100

## 10 **Aplicabilidad industrial**

15 El cristal del compuesto A de la presente invención, que posee la forma cristalina particular mencionada anteriormente, muestra un efecto anti-VIH así como una estabilidad cristalina superior. Por lo tanto, es útil como un material de partida de una composición farmacéutica, particularmente, de diversas composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento del SIDA.

20 Esta solicitud se basa en la solicitud de patente N° 2004-150979 presentada en Japón, cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento. Todas las referencias citadas en el presente documento, incluyendo patentes, solicitudes y publicaciones de patente se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento.



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Japan Tobacco Inc.

5 <120> Cristal Estable del Compuesto 4-Oxoquinolina

<130> 09765

<150> JP2004-150979

10 <151> 20-5-2004

<160> 4

<210> 1

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cadena positiva donante para la determinación de la actividad de la integrasa del VIH.

<400> 1

acccttttag tcagtggtgga aaatctctag ca 32

<210> 2

25 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cadena negativa donante para la determinación de la actividad de la integrasa del VIH.

<400> 2

actgctagag atttccaca ctgactaaaa g 31

<210> 3

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Cadena positiva diana para la determinación de la actividad de la integrasa del VIH.

<400> 3

tgaccaaggg ctaattcact 20

<210> 4

45 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Cadena negativa diana para la determinación de la actividad de la integrasa del VIH.

<400> 4

55 agtgaattag cccttggtca 20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cristal (forma cristalina II) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos de difracción característicos en ángulos de difracción  $2\theta(^{\circ})$  de 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22<sup>o</sup> medidos por un difractómetro de polvo de rayos X.
- 10 2. Un cristal (forma cristalina III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos de difracción característicos en ángulos de difracción  $2\theta(^{\circ})$  de 8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74<sup>o</sup> medido por un difractómetro de polvo de rayos X.
- 15 3. Un cristal (forma cristalina III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, que posee una temperatura de inicio extrapolada de  $162,1 \pm 5,0$  °C.
4. El cristal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que posee una pureza de cristal no inferior al 70%.
5. Un cristal mixto que comprende el cristal de la reivindicación 1 y el cristal de la reivindicación 2 ó 3.
- 20 6. El cristal mixto de la reivindicación 5, en el que la pureza del cristal no es inferior del 70%.
7. Una composición farmacéutica que comprende el cristal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el cristal mixto de la reivindicación 5 ó 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 8. Un inhibidor de integrasa que comprende el cristal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el cristal mixto de la reivindicación 5 ó 6 como ingrediente activo.
- 30 9. Un agente antivírico que comprende el cristal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el cristal mixto de la reivindicación 5 ó 6 como ingrediente activo.
10. Un agente anti-VIH que comprende el cristal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el cristal mixto de la reivindicación 5 ó 6 como ingrediente activo.

Fig. 1

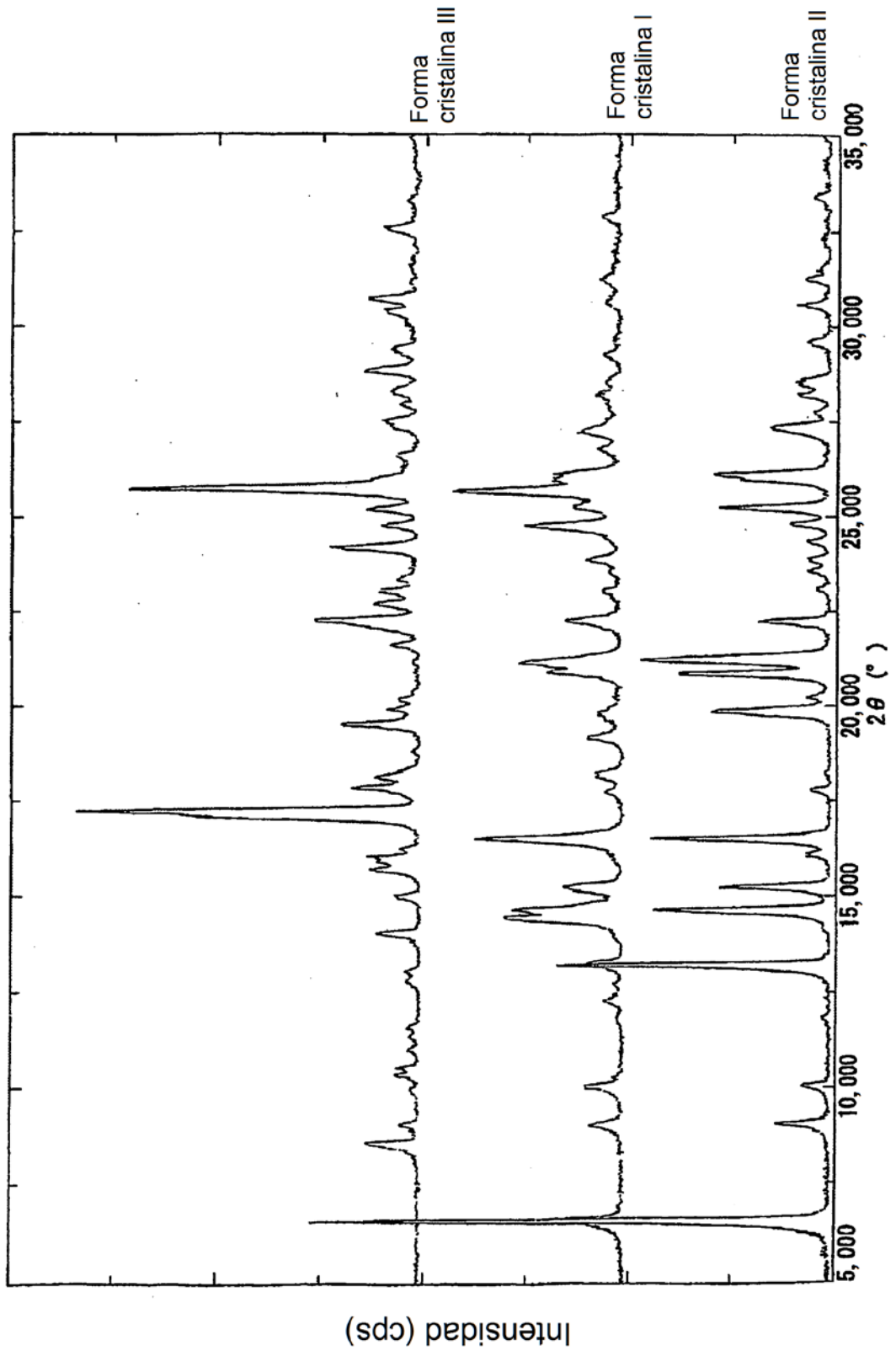
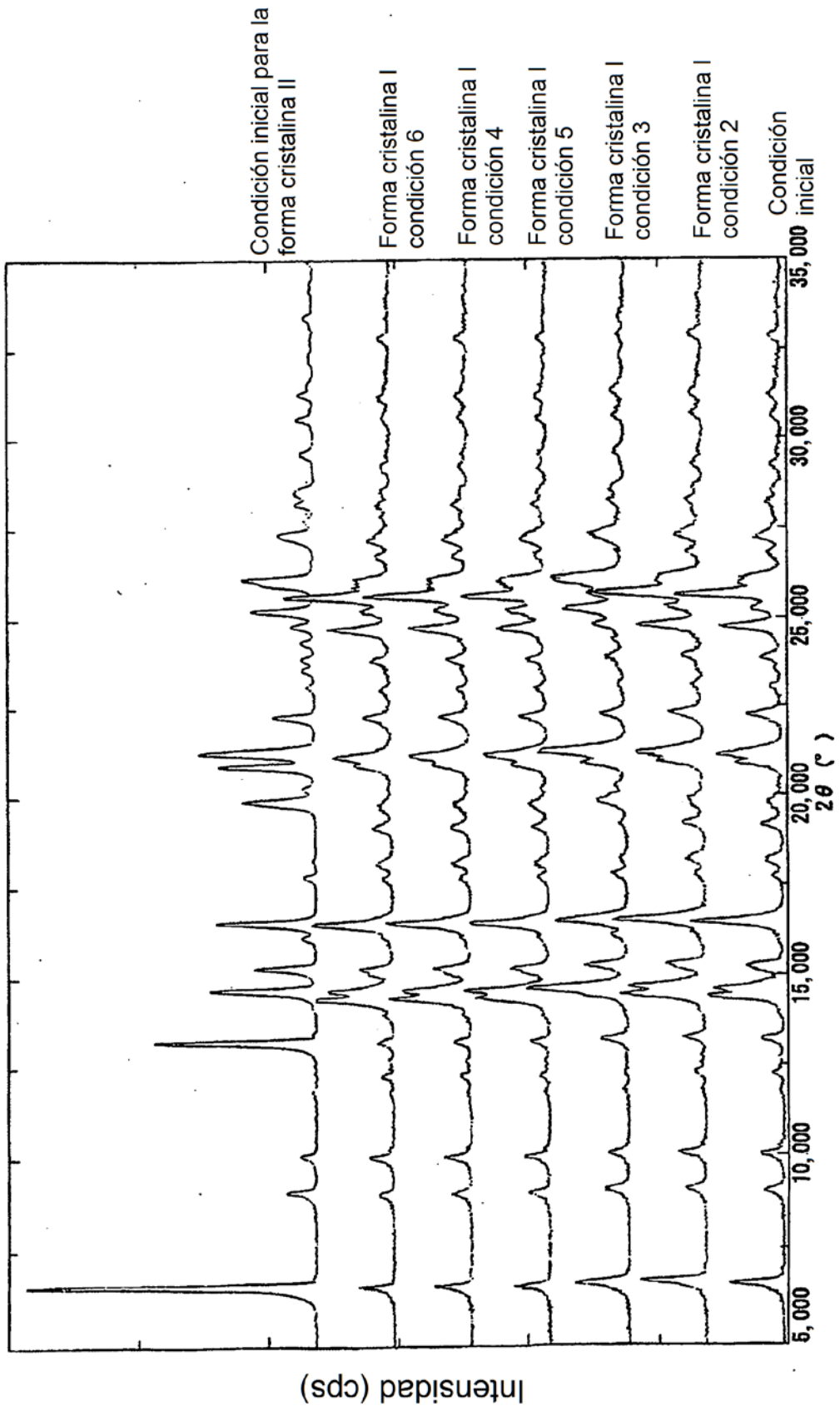


Fig. 2



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- JP 3567162 B [0002]
- JP 2004150979 A [0194] [0195]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- J. Virol., 1993, vol. 67, 425-437 [0176]