(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 402 808**

(51) Int. CI.:

C07D 401/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2004 E 11185767 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2426118**

(54) Título: **Métodos de obtención de formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona**

(30) Prioridad:

04.09.2003 US 499723 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2013

(73) Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)
86 Morris Avenue
SummitNew Jersey 07901, US

(72) Inventor/es:

CHEN, ROGER SHEN-CHU;
MULLER, GEORGE W.;
JAWORSKY, MARKIAN S.;
SAINDANE, MANOHAR T. y
CAMERON, LOUISE

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de obtención de formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona.

Esta invención se refiere a procedimientos para preparar formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. También se describen composiciones que comprenden las formas polimórficas, métodos de obtención de las formas polimórficas y métodos de su uso para el tratamiento de enfermedades y dolencias que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y cáncer.

Muchos compuestos pueden existir en diferentes formas cristalinas, o polimorfos, que exhiben diferentes propiedades físicas, químicas y espectroscópicas. Por ejemplo, ciertos polimorfos de un compuesto pueden ser más fácilmente solubles en disolventes particulares, pueden fluir más fácilmente, o pueden comprimirse más fácilmente que otros. Véase, p.ej., P. DiMartino, *et al*., *J. Thermal. Anal.*, 48:447-458 (1997). En el caso de los fármacos, ciertas formas sólidas pueden ser más fácilmente biodisponibles que otras, mientras que otras pueden ser más estables bajo ciertas condiciones biológicas, de fabricación y almacenamiento. Esto es particularmente importante desde un punto de vista regulatorio, dado que los fármacos son aprobados por agencias tales como la Administración para Alimentos y Fármacos de Estados Unidos sólo si cumplen estándares exactos de pureza y caracterización. De hecho, la aprobación regulatoria de un polimorfo de un compuesto, que exhibe ciertas propiedades de solubilidad y físico-químicas (incluyendo espectroscópicas), típicamente no implica la aprobación fácil de otros polimorfos de ese mismo compuesto.

En las técnicas farmacéuticas se sabe que las formas polimórficas de un compuesto afectan, por ejemplo, a la solubilidad, estabilidad, capacidad de fluir, fractabilidad y compresibilidad del compuesto, así como a la seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos que lo comprenden. Véase, p.ej., Knapman, K. *Modern Drug Discoveries*, 2000, 53. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos polimorfos de un fármaco puede proporcionar una variedad de ventajas.

Las patentes de EE.UU. Nos. 5.635.517 y 6.281.230, ambas de Muller *et al*., describen 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona, que es útil en el tratamiento y prevención de un amplio intervalo de dolencias, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y cáncer. Nuevas formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona pueden promover el desarrollo de formulaciones para el tratamiento de estas enfermedades crónicas, y pueden proporcionar numerosos beneficios de formulación, fabricación y terapéuticos.

Esta invención proporciona métodos de obtención de polimorfos de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos específicos de la invención pueden ser entendidos con referencia a las figuras adjuntas:

La FIGURA 1 proporciona un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD, por sus siglas en inglés) representativo de la Forma A;

La FIGURA 2 proporciona un espectro de IR representativo de la Forma A;

La FIGURA 3 proporciona un espectro Raman representativo de la Forma A;

La FIGURA 4 proporciona una curva de análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) representativa y un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés) representativo de la Forma A;

La FIGURA 5 proporciona un isotermo de sorción/desorción de humedad representativo de la Forma A;

La FIGURA 6 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma B;

La FIGURA 7 proporciona un espectro de IR representativo de la Forma B;

La FIGURA 8 proporciona un espectro Raman representativo de la Forma B;

La FIGURA 9 proporciona una curva de TGA representativa y un termograma de DSC representativo de la Forma B;

La FIGURA 10 proporciona resultados de TG-IR representativos de la Forma B;

La FIGURA 11 proporciona un isotermo de sorción/desorción de humedad representativo de la Forma B;

La FIGURA 12 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma C;

La FIGURA 13 proporciona un espectro de IR representativo de la Forma C;

La FIGURA 14 proporciona un espectro Raman representativo de la Forma C;

La FIGURA 15 proporciona una curva de TGA representativa y un termograma de DSC representativo de la Forma

C;

La FIGURA 16 proporciona resultados de TG-IR representativos de la Forma C;

La FIGURA 17 proporciona un isotermo de sorción/desorción de humedad representativo de la Forma C;

La FIGURA 18 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma D;

La FIGURA 19 proporciona un espectro de IR representativo de la Forma D;

La FIGURA 20 proporciona un espectro Raman representativo de la Forma D;

La FIGURA 21 proporciona una curva de TGA representativa y un termograma de DSC representativo de la Forma D;

La FIGURA 22 proporciona un isotermo de sorción/desorción de humedad representativo de la Forma D;

La FIGURA 23 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma E;

La FIGURA 24 proporciona una curva de TGA representativa y un termograma de DSC representativo de la Forma E;

La FIGURA 25 proporciona un isotermo de sorción/desorción de humedad representativo de la Forma E;

La FIGURA 26 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma F;

La FIGURA 27 proporciona un termograma representativo de la Forma F;

La FIGURA 28 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma G;

La FIGURA 29 proporciona un termograma de DSC representativo de la Forma G;

La FIGURA 30 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma H;

La FIGURA 31 proporciona una curva de TGA representativa y un termograma de DSC representativo de la Forma H;

La FIGURA 32 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma B;

La FIGURA 33 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma B;

La FIGURA 34 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma B;

La FIGURA 35 proporciona un patrón de XRPD representativo de la Forma E;

La FIGURA 36 proporciona un patrón de XRPD representativo de una mezcla de polimorfos;

La FIGURA 37 proporciona una curva de TGA representativa de la Forma B;

La FIGURA 38 proporciona una curva de TGA representativa de la Forma B;

La FIGURA 39 proporciona una curva de TGA representativa de la Forma B;

La FIGURA 40 proporciona una curva de TGA representativa de la Forma E;

La FIGURA 41 proporciona una curva de TGA representativa de una mezcla de polimorfos;

La FIGURA 42 proporciona un termograma de DSC representativo de la Forma B;

La FIGURA 43 proporciona un termograma de DSC representativo de la Forma B;

La FIGURA 44 proporciona un termograma de DSC representativo de la Forma B;

La FIGURA 45 proporciona un termograma de DSC representativo de la Forma E;

La FIGURA 46 proporciona un termograma de DSC representativo de una mezcla de polimorfos;

La FIGURA 47 proporciona un barrido UV-Vis de un medio de disolución;

La FIGURA 48 proporciona un barrido UV-Vis de 0,04 mg/ml de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en el medio de disolución;

La FIGURA 49 proporciona un barrido UV-Vis de 0,008 mg/ml de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en el medio de disolución;

La FIGURA 50 proporciona una curva de calibración para 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona;

La FIGURA 51 proporciona una curva de solubilidad de la Forma A;

La FIGURA 52 proporciona una curva de solubilidad de la Forma B;

La FIGURA 53 proporciona una disolución intrínseca de las Formas A, B y E; y

La FIGURA 54 proporciona una disolución intrínseca de las Formas A, B y E.

Como se emplean en la presente memoria, y a menos que se indique de otro modo, los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren al alivio de una enfermedad o trastorno y/o al menos uno de sus síntomas acompañantes.

Como se emplean en la presente memoria, y a menos que se indique de otro modo, los términos “prevenir”, “previniendo” y “prevención” se refieren a la inhibición de un síntoma de una enfermedad o trastorno o de la enfermedad en sí.

Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otro modo, los términos “polimorfo” y “forma polimórfica” se refieren a formas cristalinas sólidas de un compuesto o complejo. Diferentes polimorfos del mismo compuesto pueden exhibir diferentes propiedades físicas, químicas y/o espectroscópicas. Las diferentes propiedades físicas incluyen, pero no se limitan a, estabilidad (p.ej., al calor o a la luz), compresibilidad y densidad (importante en formulación y fabricación de productos), y velocidades de disolución (que pueden afectar a la biodisponibilidad). Las diferencias en estabilidad pueden ser el resultado de cambios en la reactividad química (p.ej., oxidación diferencial, de tal modo que una forma de dosificación se decolora más rápidamente cuando está comprendida de un polimorfo que cuando está comprendida de otro polimorfo) o características mecánicas (p.ej., los comprimidos se desmenuzan en el almacenamiento, ya que un polimorfo favorecido cinéticamente se convierte en un polimorfo termodinámicamente más estable) o ambos (p.ej., los comprimidos de un polimorfo son más susceptibles a la rotura a humedad alta). Las diferentes propiedades físicas de los polimorfos pueden afectar a su procesamiento. Por ejemplo, un polimorfo podría ser más propenso a formar solvatos o podría ser más difícil de liberar de impurezas por filtración o lavado que otro, debido a, por ejemplo, la forma o distribución de tamaños de sus partículas.

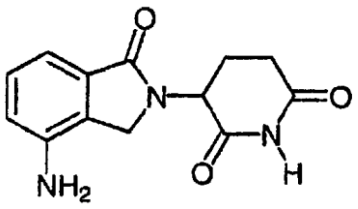
Se pueden obtener polimorfos de una molécula mediante varios métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, recristalización en estado fundido, enfriamiento en estado fundido, recristalización en disolvente, desolvatación, evaporación rápida, enfriamiento rápido, enfriamiento lento, difusión de vapor y sublimación. Los polimorfos pueden ser detectados, identificados, clasificados y caracterizados usando técnicas bien conocidas, tales como, pero no limitadas a, calorimetría de barrido diferencial (DSC), termogravimetría (TGA), difractometría de rayos X en polvo (XRPD), difractometría de rayos X de cristal único, espectroscopía vibracional, calorimetría de disolución, resonancia magnética nuclear (NMR) de estado sólido, espectroscopía de infrarrojo (IR), espectroscopía Raman, microscopía óptica de platina caliente, microscopía de barrido electrónico (SEM), cristalografía electrónica y análisis cuantitativo, análisis de tamaños de partícula (PSA), análisis de área superficial, solubilidad y velocidad de disolución.

Como se emplea en la presente memoria para hacer referencia a los espectros o datos presentados en forma gráfica (p.ej., XRPD, espectros de IR, Raman y NMR), y a menos que se indique de otro modo, el término “pico” se refiere a un pico u otro rasgo especial que un experto en la técnica reconocería como no atribuible a ruido de fondo. El término “picos significativos” se refiere a picos de al menos la mediana del tamaño (p.ej., altura) de otros picos en el espectro o datos, o al menos 1,5, 2 o 2,5 veces de la mediana del tamaño de otros picos en el espectro o datos.

Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otro modo, el término “sustancialmente puro”, cuando se usa para describir un polimorfo de un compuesto, significa una forma sólida del compuesto que comprende ese polimorfo y está sustancialmente exenta de otros polimorfos del compuesto. Un polimorfo sustancialmente puro representativo comprende más que 80% en peso de una forma polimórfica del compuesto y menos que 20% en peso de otras formas polimórficas del compuesto, más preferiblemente más que 90% en peso de una forma polimórfica del compuesto y menos que 10% en peso de otras formas polimórficas del compuesto, incluso más preferiblemente más que 95% en peso de una forma polimórfica del compuesto y menos que 5% en peso de otras formas polimórficas del compuesto, y lo más preferiblemente más que 97% en peso de una forma polimórfica del compuesto y menos que 3% en peso de otras formas polimórficas del compuesto.

Formas polimórficas

Está invención está dirigida a procedimientos para preparar formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona, que tiene la estructura mostrada a continuación:



Este compuesto se puede preparar según los métodos descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 6.281.230 y 5.635.517. Por ejemplo, el compuesto se puede preparar mediante hidrogenación catalítica de 3-(4-nitro-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. La 3-(4-nitro-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona se puede obtener dejando reaccionar cloruro de 2,6-dioxopieridin-3-amonio con 2-bromometil-4-nitrobenzoato de metilo en dimetilformamida en presencia de trietilamina. El 2-bromometil-4-nitrobenzoato de metilo, a su vez, se obtiene a partir del correspondiente éster metílico de ácido nitro-orto-toluico por bromación convencional con N-bromosuccinimida bajo la influencia de la luz.

Los polimorfos de la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona se pueden obtener por técnicas conocidas en la técnica, incluyendo recristalización de disolvente, desolvatación, evaporación rápida, evaporación lenta, enfriamiento rápido y enfriamiento lento. Los polimorfos se pueden preparar disolviendo una cantidad pesada de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en diversos disolventes a temperaturas elevadas. Después, las disoluciones del compuesto se pueden filtrar y dejar evaporar, bien en un vial abierto (para evaporación rápida en caliente) o bien en un vial cubierto con papel de aluminio que contiene pequeños orificios (evaporación lenta en caliente). Los polimorfos también se pueden obtener a partir de suspensiones. Los polimorfos pueden ser cristalizados a partir de disoluciones o suspensiones usando varios métodos. Por ejemplo, una disolución creada a una temperatura elevada (p.ej., 60 ºC) puede ser filtrada rápidamente, y después dejarse enfriar hasta la temperatura ambiente. Una vez a temperatura ambiente, la muestra que no cristalizó puede ser trasladada a un frigorífico, y filtrada después. Alternativamente, las disoluciones pueden ser enfriadas rápidamente disolviendo el sólido en un disolvente a una temperatura aumentada (p.ej., 45-65 ºC) seguido de enfriamiento en un baño de hielo seco/disolvente.

La Forma A es un material cristalino, no solvatado, que se puede obtener a partir de sistemas disolventes no acuosos. La Forma B es un material cristalino, hemihidratado, que se puede obtener a partir de varios sistemas disolventes. La Forma C es un material cristalino hemisolvatado que se puede obtener a partir de disolventes tales como, pero no limitados a, acetona. La Forma D es un polimorfo solvatado, cristalino, preparado a partir de una mezcla de acetonitrilo y agua. La forma E es un material cristalino, dihidratado. La Forma F es un material cristalino, no solvatado, que se puede obtener a partir de la deshidratación de la Forma E. La Forma G es un material cristalino, no solvatado, que se puede obtener a partir de suspender las Formas B y E en un disolvente tal como, pero no limitado a, tetrahidrofurano (THF). La Forma H es un material cristalino parcialmente hidratado que se puede obtener exponiendo la Forma E a 0% de humedad relativa. Cada una de estas formas se discute en detalle a continuación.

También se describe una composición que comprende 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona amorfa y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona cristalina de la forma A, B C, D, E, F, G o H. Composiciones específicas pueden comprender más que 50, 75, 90 o 95 por ciento en peso de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona cristalina.

También se describe una composición que comprende al menos dos formas cristalinas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona (p.ej., una mezcla de las formas polimórficas B y E).

Forma A

Los datos descritos en la presente memoria para la Forma A, así como para las Formas B-H, se obtuvieron usando los métodos experimentales descritos en los Ejemplos que tratan sobre las medidas de XRPD, análisis térmico, espectroscopía, sorción/desorción de humedad y NMR, proporcionados más adelante.

La Forma A se puede obtener a partir de diversos disolventes, que incluyen, pero no se limitan a, 1-butanol, acetato de butilo, etanol, acetato de etilo, metanol, metiletilcetona y THF. La Figura 1 muestra un patrón de XRPD representativo de la Forma A. El patrón se caracteriza por picos, preferiblemente picos significativos, a 8, 14,5, 16, 17,5, 20,5, 24 y 26 grados 2θ. Se proporcionan datos de los espectros IR y Raman representativos en las Figuras 2 y 3.

Las características térmicas representativas de la Forma A se muestran en la Figura 4. Los datos de TGA muestran un pequeño aumento de peso hasta aproximadamente 150 ºC, indicando un material no solvatado. La pérdida de peso por encima de 150 ºC es atribuida a la descomposición. La curva DSC de la Forma A exhibe un endotermo a 270 ºC.

Los datos de sorción y desorción de humedad representativos se representan gráficamente en la Figura 5. La Forma

A no exhibe una ganancia de peso significativa de 5 a 95% de humedad relativa. Se puede obtener el equilibrio en cada etapa de humedad relativa. Según se seca la forma desde 95% de vuelta hasta 5% de humedad relativa, tiende a mantener su peso, de tal modo que a 5% de humedad relativa ha perdido típicamente sólo 0,003% en peso desde el inicio hasta el final. La Forma A es capaz de permanecer como un sólido cristalino durante 11 días cuando se almacena a 22, 45, 58 y 84% de humedad relativa.

Estudios de interconversión muestran que la Forma A puede convertirse en la Forma B en sistemas disolventes acuosos y puede convertirse en la Forma C en sistemas disolventes de acetona. La Forma A tiende a ser estable en sistemas disolventes anhidros. En sistemas acuosos y en presencia de la Forma E, la Forma A tiende a convertirse en la Forma E.

Cuando se almacena durante un periodo de 85 días bajo dos condiciones de tensión por temperatura/humedad relativa diferentes (temperatura ambiente/0% de humedad relativa (RH, por sus siglas en inglés) y 40 ºC/93% de RH), típicamente la Forma A no se convierte en una forma diferente.

En suma, la Forma A es un sólido cristalino, no solvatado, que se funde a 270 ºC. La Forma A es débilmente o no higroscópica, y parece ser el polimorfo anhidro más termodinámicamente estable de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona descubierto hasta ahora.

Forma B

La Forma B se puede obtener a partir de muchos disolventes, que incluyen, pero no se limitan a, hexano, tolueno y agua. La Figura 6 muestra un patrón de XRPD representativo de la Forma B, caracterizado por picos a 16, 18, 22 y 27 grados 2θ.

La NMR de protones en disolución confirma que la Forma B es una forma de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Se muestran espectros de IR y Raman representativos en las Figuras 7 y 8, respectivamente. Comparado con la Forma A, el espectro de IR para la Forma B tiene picos a 3513 y 1960 cm^{-1}.

Se muestran datos de DSC y TGA representativos para la Forma B en la Figura 9. La curva de DSC exhibe endotermos a 146 y 268 ºC. Estos eventos se identifican como deshidratación y fusión por experimentos de microscopía de platina caliente. La Forma B típicamente pierde 3,1% de volátiles hasta 175 ºC (por 0,46 moles de agua). La comparación del espectro de IR de los volátiles con el del agua indica que éstos son agua (véase la Figura 10). Los cálculos a partir de los datos de TGA indican que la Forma B es un hemihidrato. El análisis de agua Karl Fischer también apoya esta conclusión.

Se muestran datos de sorción y desorción de humedad representativos en la Figura 11. La Forma B típicamente no exhibe una ganancia de peso significativa de 5% a 95% de humedad relativa, cuando se obtiene el equilibrio en cada etapa de humedad relativa. Según se seca la Forma B desde 95% de vuelta hasta 5% de humedad relativa, tiende a mantener su peso, de tal modo que a 5% de humedad relativa ha ganado típicamente sólo 0,022% en peso (0,03 mg) desde el inicio hasta el final. La Forma B no se convierte en una forma diferente tras la exposición a 84% de humedad relativa durante diez días.

Estudios de interconversión muestran que la Forma B se convierte típicamente en la Forma A en un sistema disolvente de THF, y típicamente se convierte en la Forma C en un sistema disolvente de acetona. En sistemas disolventes acuosos tales como agua pura y disoluciones al 10% de agua, la Forma B es la más estable de las formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Sin embargo, puede convertirse en la Forma E en presencia de agua. Experimentos de desolvatación muestran que tras un calentamiento a 175 ºC durante cinco minutos, la Forma B típicamente se convierte en la Forma A.

Cuando se almacena durante un periodo de 85 días bajo dos condiciones de tensión por temperatura/humedad relativa diferentes (temperatura ambiente/0% de RH y 40 ºC/93% de RH), la Forma B no se convierte en una forma diferente.

En suma, la Forma B es un sólido cristalino, hemihidratado, que tiene un termograma de DSC que exhibe endotermos a 146 y 268 ºC. Estudios de interconversión muestran que la Forma B se convierte en la Forma E en sistemas disolventes acuosos, y se convierte en otras formas en acetona y otros sistemas anhidros.

Forma C

La Forma C se puede obtener a partir de evaporaciones, suspensiones y enfriamientos lentos en sistemas disolventes de acetona. Se muestra un patrón de XRPD representativo de esta forma en la Figura 12. Los datos se caracterizan por picos a 15,5 y 25 grados 2θ.

La NMR de protones en disolución indica que la molécula de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona está intacta. Se muestran espectros de IR y Raman representativos en las Figuras 13 y 14, respectivamente. El espectro de IR de la Forma C se caracteriza por picos a 3466, 3373 y 3318 cm^{-1}. El espectro Raman de la Forma C se caracteriza por picos a 3366, 3321, 1101 y 595 cm^{-1}.

Se representan características térmicas representativas para la Forma C en la Figura 15. La Forma C pierde 10,02% de volátiles hasta 175 ºC, indicando que es un material solvatado. La pérdida de peso por encima de 175 ºC es atribuida a la descomposición. La identificación de los volátiles en la Forma C se puede llevar a cabo con experimentos de TG-IR. El espectro de IR representativo capturado después de varios minutos de calentamiento, como se representa en la Figura 13, cuando se compara con una librería espectral, muestra que la acetona es la que mejor concuerda. Los cálculos realizados a partir de los datos de TGA muestran que la Forma C es un hemisolvato (0,497 moles de acetona). La curva DSC para la Forma C, mostrada en la Figura 15, exhibe endotermos a 150 y 269 ºC. El endotermo a 150 ºC es atribuido a la pérdida del disolvente, en base a observaciones hechas durante experimentos de microscopía de platina caliente. El endotermo a 269 ºC es atribuido a la fusión, en base a experimentos de platina caliente.

Se muestran datos del equilibrio de sorción y desorción de humedad representativos en la Figura 17. La Forma C no exhibe una ganancia de peso significativa de 5 a 85% de humedad relativa, cuando se obtiene el equilibrio en cada etapa de humedad relativa hasta 85% de humedad relativa. A 95% de humedad relativa, la Forma C experimenta una pérdida de peso significativa de 6,03%. Según se seca la muestra desde 95% de vuelta a 5% de humedad relativa, la muestra mantiene el peso alcanzado al final de la fase de adsorción en cada etapa hasta 5% de humedad relativa. La Forma C es capaz de convertirse en la Forma B cuando se almacena a 84% de humedad relativa durante diez días.

Estudios de interconversión muestran que la Forma C se convierte típicamente en la Forma A en un sistema disolvente de THF, y típicamente se convierte en la Forma E en un sistema disolvente acuoso. En un sistema disolvente de acetona, la Forma C es la más estable de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Experimentos de desolvatación realizados sobre la Forma C muestran que tras un calentamiento a 150 ºC durante cinco minutos, la Forma C típicamente se convertirá en la Forma A.

En suma, la Forma C es un sólido cristalino, hemisolvatado, que tiene un termograma de DSC que exhibe endotermos a 150 y 269 ºC. La Forma C no es higroscópica por debajo de 85% de RH, pero puede convertirse en la Forma B a humedades relativas más altas.

Forma D

La Forma D se puede obtener a partir de evaporación en sistemas disolventes de acetonitrilo. Se muestra un patrón de XRPD representativo de la forma en la Figura 18. El patrón se caracteriza por picos a 27 y 28 grados 2θ.

La NMR de protones en disolución indica que la molécula de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona está intacta. Se muestran espectros de IR y Raman representativos en las Figuras 19 y 20, respectivamente. El espectro de IR de la Forma D se caracteriza por picos a 3509, 2299 y 2256 cm^{-1}. El espectro Raman de la Forma D se caracteriza por picos a 2943, 2889, 2297, 2260 y 1150 cm^{-1}.

Se representan gráficamente características térmicas representativas para la Forma D en la Figura 21. La Forma D pierde 6,75% de volátiles hasta 175 ºC, indicando que es un material solvatado. La pérdida de peso por encima de 175 ºC es atribuida a la descomposición. Los experimentos de TG-IR indican que los volátiles son agua y acetonitrilo. Los cálculos realizados a partir de los datos de TG muestran que está presente un mol de agua en la muestra. Una curva DSC representativa para la Forma D exhibe endotermos a 122 y 270 ºC. El endotermo a 122 ºC es atribuido a la pérdida de volátiles en base a observaciones hechas durante experimentos de microscopía de platina caliente. El endotermo a 270 ºC es atribuido a la fusión en base a experimentos de platina caliente.

Se representan gráficamente datos de sorción y desorción de humedad representativos en la Figura 22. La Forma D no exhibe una ganancia de peso significativa de 5 a 95% de humedad relativa, cuando se obtiene el equilibrio en cada etapa de humedad relativa. Según se seca la muestra desde 95% de vuelta a 5% de humedad relativa, la muestra mantiene su peso, de tal modo que a 5% de humedad relativa la forma ha ganado típicamente sólo 0,39% en peso (0,012 mg) desde el inicio hasta el final. La Forma D es capaz de convertirse en la Forma B cuando se almacena a 84% de humedad relativa durante diez días.

Estudios de interconversión muestran que la Forma D es capaz de convertirse en la Forma A en un sistema disolvente de THF, en la Forma E en un sistema disolvente acuoso, y en la Forma C en un sistema disolvente de acetona. Experimentos de desolvatación realizados sobre la Forma D muestran que tras un calentamiento a 150 ºC durante aproximadamente cinco minutos, la Forma D típicamente se convertirá en la Forma A.

En suma, la Forma D es un sólido cristalino, solvatado tanto con agua como acetonitrilo, que tiene un termograma de DSC que exhibe endotermos a 122 y 270 ºC. La Forma D es débilmente o no higroscópica, pero se convertirá típicamente en la Forma B cuando se someta a humedades relativas más altas.

Forma E

La Forma E se puede obtener suspendiendo 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en agua y mediante una evaporación lenta de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en un sistema disolvente con una relación de 9:1 de acetona:agua. Se muestra un patrón de XRPD representativo en la Figura 23.

Los datos se caracterizan por picos a 20, 24,5 y 29 grados 2θ.

Se representan gráficamente características térmicas representativas de la Forma E en la Figura 24. La Forma E pierde típicamente 10,58% de volátiles hasta 125 ºC, indicando que es un material solvatado. Se observó una segunda pérdida de peso de 1,38% adicional entre 125 ºC y 175 ºC. La pérdida de peso por encima de 175ºC es atribuida a la descomposición. Los experimentos de Karl Fischer y de TG-IR apoyan la conclusión de que la pérdida de peso de volátiles en la Forma E es debida a agua. La curva DSC representativa para la Forma E exhibe endotermos de 99, 161 y 269 ºC. En base a las observaciones hechas durante experimentos de microscopía de platina caliente, los endotermos a 99 y 161 ºC son atribuidos a la pérdida de volátiles. El endotermo a 269 ºC es atribuido a la fusión en base a experimentos de platina caliente.

Se representan gráficamente datos de sorción y desorción de humedad representativos en la Figura 25. La Forma E típicamente no exhibe un cambio de peso significativo de 5 a 95% de humedad relativa cuando se obtiene el equilibrio en cada etapa de humedad relativa. Según se seca la muestra de 95% de vuelta a 5% de humedad relativa, la muestra continúa manteniendo el peso, de tal modo que a 5% de humedad relativa la muestra ha perdido sólo 0,0528% en peso desde el inicio hasta el final.

Estudios de interconversión muestran que la Forma E puede convertirse en la Forma C en un sistema disolvente de acetona, y en la Forma G en un sistema disolvente de THF. En sistemas disolventes acuosos, la forma E parece ser la forma más estable. Experimentos de desolvatación realizados sobre la Forma E muestran que tras un calentamiento a 125 ºC durante cinco minutos, la Forma E puede convertirse en la Forma B. Tras un calentamiento a 175 ºC durante cinco minutos, la Forma B puede convertirse en la Forma F.

Cuando se almacena durante un periodo de 85 días bajo dos condiciones de tensión de temperatura/humedad relativa diferentes (temperatura ambiente/0% de RH y 40 ºC/93% de RH), la Forma E típicamente no se convierte en una forma diferente. Cuando se almacena durante siete días a temperatura ambiente/0% de RH, la Forma E puede convertirse en una nueva forma, la Forma H.

Forma F

La Forma F se puede obtener por deshidratación completa de la Forma E. Un patrón de XRPD representativo de la Forma F, mostrado en la Figura 26, se caracteriza por picos a 19, 19,5 y 25 grados 2θ.

Se muestran características térmicas representativas de la Forma F en la Figura 27. La curva DSC representativa para la Forma F exhibe un endotermo a 269 ºC, precedido directamente por dos endotermos más pequeños indicativos de una forma cristalizada de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. El termograma DSC no muestra ningún evento térmico antes de la fusión, sugiriendo que es un material no solvatado.

Forma G

La Forma G se puede obtener suspendiendo las formas B y E en THF. Un patrón de XRPD representativo de esta forma, mostrado en la Figura 28, se caracteriza por un pico a 23 grados 2θ. Aparecen otros dos picos únicos de la Forma G a 21 y 24,5 grados 2θ.

Se representan gráficamente características térmicas representativas de la Forma G en la Figura 29. Una curva DSC representativa para la Forma G exhibe un endotermo a 248 ºC, seguido de un exotermo pequeño, amplio, a 267 ºC. No se ven eventos térmicos en el termograma DSC a temperaturas más bajas, sugiriendo que es un material no solvatado.

Forma H

La Forma H se puede obtener almacenando la Forma E a temperatura ambiente y 0% de RH durante 7 días. Se muestra un patrón de XRPD representativo en la Figura 30. El patrón se caracteriza por un pico a 15 grados 2θ, y otros dos picos a 26 y 31 grados 2θ.

Se muestran características térmicas representativas en la Figura 31. La Forma H pierde aproximadamente 1,67% de volátiles hasta 150 ºC. La pérdida de peso por encima de 150 ºC es atribuida a la descomposición. Los datos de Karl Fischer muestran que la Forma H contiene típicamente 1,77% de agua (0,26 moles), sugiriendo que la pérdida de peso vista en el TG es debida a la deshidratación. El termograma DSC muestra un amplio endotermo entre 50 ºC y 125 ºC, que corresponde a la deshidratación de la Forma H, y un endotermo estrecho a 269 ºC, que es probablemente debido a una fusión.

Cuando se suspende en agua bien con la Forma A o bien con la B, después de 14 días, la Forma H puede convertirse en la Forma E. Cuando se suspende en THF, la Forma H puede convertirse en la Forma A. Cuando se suspende en acetona, la Forma H puede convertirse en la Forma C.

En suma, la Forma H es un sólido cristalino, hidratado, con 0,25 moles de agua que tiene un termograma de DSC que exhibe un endotermo entre 50 y 125 ºC, y un endotermo a 269 ºC.

Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

Los polimorfos descritos en esta memoria exhiben características físicas que son beneficiosas para la fabricación, almacenamiento o uso de fármacos. Todos los polimorfos descritos en esta memoria tienen utilidad como ingredientes farmacéuticamente activos o compuestos intermedios de los mismos.

En esta memoria se describen métodos para tratar y prevenir una amplia variedad de enfermedades y dolencias usando polimorfos de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. En cada uno de los métodos, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto se administra a un paciente necesitado de tal tratamiento o prevención. Los ejemplos de tales enfermedades y dolencias incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con angiogénesis indeseada, cáncer (p.ej. , tumores sólidos y transmitidos por la sangre), enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y enfermedades inmunes. Los ejemplos de cánceres y dolencias precancerosas incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. nos. 6.281.230 y 5.635.517 de Muller *et al*. y en diversas solicitudes de patente de EE.UU. de Zeldis, incluyendo las solicitudes nos. 10/411.649, presentada el 11 de abril de 2003 (Tratamiento del Síndrome Mielodisplásico); 10/438.213 presentada el 15 de mayo de 2003 (Tratamiento de Diversos Tipos de Cáncer); 10/411.656, presentada el 11 de abril de 2003 (Tratamiento de Enfermedades Mieloproliferativas). Se describen ejemplos de otras enfermedades y trastornos que pueden ser tratados o prevenidos usando las composiciones de la invención en las patentes de EE.UU. nos. 6.235.756 y 6.114.335 de D'Amato y en otras solicitudes de patente de EE.UU. de Zeldis, que incluyen 10/693.794, presentada el 23 de octubre de 2003 (Tratamiento del Síndrome del Dolor) y 10/699.154, presentada el 30 de octubre de 2003 (Tratamiento de la Degeneración Macular).

Dependiendo de la enfermedad a ser tratada y el estado del paciente, los polimorfos de la invención pueden ser administrados por vía de administración oral, parenteral (p.ej., intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ICV, inyección o infusión intracisternal, inyección subcutánea o implantación), por pulverizador de inhalación, nasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica, y pueden ser formulados, solos o juntos, en formulaciones de dosificación unitaria adecuadas que contengan excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos, apropiados para cada vía de administración. Debido a que los polimorfos individuales tienen diferentes propiedades de disolución, estabilidad y otras, el polimorfo óptimo usado en los métodos de tratamiento puede depender de la vía de administración. Por ejemplo, las formas que son fácilmente solubles en disoluciones acuosas se usan preferiblemente para proporcionar formas de dosificación líquidas, mientras que las formas que exhiben gran estabilidad térmica pueden ser preferidas en la fabricación de formas de dosificación sólidas (p.ej. , comprimidos y cápsulas).

Aunque las características físicas de los polimorfos pueden, en algunos casos, afectar a su biodisponibilidad, las cantidades de los polimorfos que son terapéutica o profilácticamente eficaces en el tratamiento de diversas enfermedades o dolencias pueden ser fácilmente determinadas por los expertos habituados a la técnica farmacéutica o médica. Por ejemplo, se administra un polimorfo por vía oral y en una dosis diaria única o dividida, en una cantidad de 0,10 a 150 mg/día, o de 5 a 25 mg/día o cada dos días en una cantidad de 0,10 a 150 mg/día o de 5 a 25 mg/día.

En esta memoria se describen composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria simples que se pueden usar en métodos de tratamiento y prevención, que comprenden uno o más polimorfos de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona y opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes. Se describen composiciones y formas de dosificación específicas en las diversas patentes y solicitudes de patente citadas en la presente memoria. En una realización, una forma de dosificación simple comprende un polimorfo (p. ej., la Forma B) en una cantidad de 5, 10, 25 ó 50 mg.

6. Ejemplos

6.1. Cribado de polimorfos

Se llevó a cabo un cribado de polimorfos para generar las diferentes formas sólidas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona como sigue.

Una muestra pesada de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona (usualmente 10 mg) se trató con alícuotas del disolvente de ensayo. Los disolventes fueron de calidad reactivo o bien de calidad HPLC. Las alícuotas fueron usualmente de aproximadamente 200 µl. Entre adiciones, la mezcla fue usualmente agitada o sonicada. Cuando los sólidos se disolvieron, lo que se juzgó por inspección visual, se calcularon las solubilidades estimadas. Las solubilidades se estimaron a partir de estos experimentos en base al disolvente total usado para proporcionar una disolución. Las solubilidades reales pueden haber sido mayores que las calculadas debido al uso de alícuotas de disolvente demasiado grandes o a una velocidad de disolución lenta.

Se crearon muestras generando disoluciones (usualmente 30 mg en 20 ml) a temperaturas elevadas, filtrando, y dejando evaporarse la disolución, ya sea en un vial abierto (evaporación rápida en caliente) o en un vial cubierto con papel de aluminio que contiene pequeños orificios (evaporación lenta en caliente).

También se realizaron experimentos de suspensión. Usualmente se pusieron aproximadamente 25 mg de sólido en

3 o bien 5 ml de disolvente. Después las muestras se pusieron en agitadores orbitales a temperatura ambiente o bien 40 ºC durante 4-10 días.

Las cristalizaciones se realizaron usando diversos métodos de enfriamiento. Se disolvió el sólido en un disolvente a una temperatura elevada (p.ej., 60 ºC), se filtró rápidamente y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Una vez a temperatura ambiente, las muestras que no cristalizaron se llevaron a un frigorífico. Los sólidos se retiraron por filtración o decantación y se dejaron secar al aire. Se realizaron enfriamientos rápidos disolviendo el sólido en un disolvente a una temperatura aumentada (p.ej., 45-65 ºC) seguido de enfriamiento en un baño de hielo/acetona.

Se realizaron estudios de higroscopicidad poniendo porciones de cada polimorfo en una cámara a 84% de humedad relativa durante una semana.

Se llevaron a cabo estudios de desolvatación calentando cada polimorfo en una estufa a 70 ºC durante una semana.

Se llevaron a cabo experimentos de interconversión preparando suspensiones que contenían dos formas en un disolvente saturado. Las suspensiones se agitaron durante 7-20 días a temperatura ambiente. Los sólidos insolubles se recuperaron por filtración y se analizaron usando XRPD.

6.2. Preparación de las formas polimórficas

Se prepararon ocho formas sólidas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona como se describe a continuación.

La Forma A se obtuvo por cristalización a partir de diversos disolventes no acuosos, que incluyen 1-butanol, acetato de butilo, etanol, acetato de etilo, metanol, metiletilcetona y tetrahidrofurano. La Forma B también se obtuvo por cristalización, a partir de los disolventes hexano, tolueno y agua. La Forma C se obtuvo a partir de evaporaciones, suspensiones y enfriamientos lentos en sistemas disolventes de acetona. La Forma D se obtuvo a partir de evaporaciones en sistemas disolventes de acetonitrilo. La Forma E se obtuvo, de la manera más fácil, suspendiendo 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en agua. La Forma F se obtuvo por desolvatación completa de la Forma E. Se encuentra que es un material cristalino, no solvatado, que se funde a 269 ºC. La Forma G se obtuvo suspendiendo las Formas B y E en THF. La Forma H se obtuvo sometiendo la Forma E a temperatura ambiente y 0% de RH durante 7 días.

6.2.1. Síntesis de los polimorfos B y E

La Forma B es el polimorfo deseado para el ingrediente farmacéutico activo (API, por sus siglas en inglés) de la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Esta forma se ha usado en la formulación del API en un producto farmacéutico para estudios clínicos. Se produjeron tres lotes como mezclas aparentes de polimorfos en el API no micronizado de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona.

Se llevó a cabo un trabajo de desarrollo para definir un procedimiento que generara el polimorfo B a partir de esta mezcla de polimorfos y pudiera ser implementado para controles polimórficos estrictos en los lotes de validación y la futura fabricación del API de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. La caracterización de las formas polimórficas producidas durante el trabajo se realizó por XRPD, DSC, TGA y KF.

También se desarrolló un procedimiento para la preparación a gran escala de la Forma E. Se preparó un material del polimorfo E a fin de llevar a cabo una comparación con el producto farmacéutico del polimorfo B en un ensayo de disolución de cápsulas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Se agitaron 150 g de una mezcla de polimorfos en 3 l de agua a temperatura ambiente durante 48 horas. El producto se recogió por filtración y se secó a 25 ºC durante 24 horas a vacío. Los análisis XRPD, DSC, TGA, KF y HPLC confirmaron que el material aislado era el polimorfo E.

En un trabajo preliminar, se demostró que agitar una suspensión de una mezcla de polimorfos de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona con agua a alta temperatura (75 ºC) durante un periodo de tiempo extenso convirtió esta mezcla de polimorfos exclusivamente en la Forma B. Se identificaron varios parámetros específicos, que incluían temperatura, volumen de disolvente y parámetros de secado (temperatura y vacío). Se usaron análisis XRPD, DSC, TGA, KF y HPLC para caracterizar todos los lotes. Después de completar el trabajo de optimización, el procedimiento optimizado fue aumentado a escala hasta 100-200 g sobre tres lotes de API. Se llevaron a cabo estudios de secado a 20 ºC, 30 ºC y 40 ºC, y 65 ºC, con un vacío de 150 mm de Hg. Los resultados se muestran en la Tablas 1-5.

Se estudiaron los periodos de enfriamiento y mantenimiento de una suspensión de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Los datos experimentales de laboratorio sugieren que parece estar formándose primero el polimorfo B, y con el tiempo se produce el equilibrado a polimorfo E en condiciones de temperatura ambiente, generándose por tanto una mezcla de polimorfos B y E. Este resultado apoya el hecho de que el polimorfo B parece ser un producto cinético, y que un tiempo de procesamiento prolongado convierte el material en polimorfo E, dando como resultado una mezcla de polimorfos B y E.

Se desarrolló un procedimiento de laboratorio para producir exclusivamente el polimorfo B de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. El procedimiento incluye una suspensión acuosa de 10 volúmenes agitada a 75 ºC durante 6-24 horas. Se han identificado los siguientes parámetros de procedimiento preferidos:

1. Temperatura de la suspensión caliente de 70-75 ºC
2. Filtración del producto de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona a 65-75 ºC.
3. Se prefiere un secado a vacío a 60-70 ºC para una retirada eficaz del agua no enlazada en la pasta húmeda de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona.
4. La etapa de filtración de la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona puede ser una operación sensible al tiempo. Se prefiere el uso de un equipo de separación sólido-líquido eficaz.
5. Periodos de mantenimiento de la pasta húmeda de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona a un KF más alto que 5% puede causar los equilibrados cinéticos del polimorfo B a polimorfos mixtos de E y B.

El secado hasta un KF < 4,0% de agua se alcanzó en 3 horas (30-70 ºC, 152 mm Hg). Los polimorfos B y E fueron distinguidos por los niveles de agua medidos por KF y TGA. La muestra de referencia del polimorfo B es API micronizado. A fin de hacer una comparación exacta por XRPD, las muestras fueron molidas suavemente antes de remitirlas al análisis. Esto aumenta la claridad de la identificación de la forma polimórfica. Todas las muestras fueron analizadas por XRPD, DSC, TGA, KF y HPLC.

Tabla 1: Estudios preliminares

Cantidad	Condiciones de reacción	Análisis	Resultados/conclusión
2 g	Agua, ta, 48 h	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo E
25 g	Agua, ta, 48 h	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo E
5 g	Agua, 70-75 ºC, 24 h, después ta 24 h	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo B
1 g	Acetona-Agua 9:1, evap. lenta	XRPD, DSC, TGA, KF	Mezcla de polimorfos
1 g	175 ºC 1 h en una estufa	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo A
0,5 g (polimorfo A)	Agua, ta, 24 h	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo E
1 g de polimorfo B	Agua, ta, 48 h	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo E
1 g de polimorfo E	Agua, 70-75 ºC, 24 h	XRPD, DSC, TGA, KF	Polimorfo B
1 g	Suspensión en heptano	XRPD, DSC, TGA, KF	Sin cambio

Tabla 2: Optimización de Temperatura, Tiempo y Volumen de Disolvente

Cantidad	Cantidad de agua (ml)	Temp. (ºC)	Tiempo (h)	Resultados/conclusión
10 g	50	75	6	Mezcla
10 g	50	75	24	Polimorfo B
10 g	100	70	6	Polimorfo B
10 g	100	70	14	Polimorfo B
10 g	100	70	21	Polimorfo B
10 g	100	75	6	Polimorfo B
10 g	100	75	24	Polimorfo B
10 g	100	75	6	Polimorfo B
10 g	100	75	19	Polimorfo B
10 g	100	75	14	Polimorfo B
10 g	100	75	24	Polimorfo B
5 g	100	75	18	Polimorfo B

Cantidad	Cantidad de agua (ml)	Temp. (ºC)	Tiempo (h)	Resultados/conclusión
10 g	50	75	6	Mezcla
10 g	50	75	24	Polimorfo B
10 g	100	70	6	Polimorfo B
10 g	100	70	14	Polimorfo B
10 g	100	70	21	Polimorfo B
10 g	100	75	6	Polimorfo B
10 g	100	75	24	Polimorfo B
10 g	100	75	6	Polimorfo B
10 g	100	75	19	Polimorfo B
10 g	100	80	6	Polimorfo B
10 g	100	80	20	Polimorfo B
10 g	200	45	6	Polimorfo B+E
10 g	200	45	24	Polimorfo E
10 g	200	60	48	Polimorfo B
10 g	200	75	6	Mezcla
10 g	200	75	24	Polimorfo B
10 g	200	75	13	Polimorfo B
10 g	200	75	24	Polimorfo B

Se determinó que las condiciones óptimas eran 10 volúmenes de disolvente (H_2O), 70-80 ºC durante 6-24 horas.

Tabla 3: Tiempo de Mantenimiento

Cantidad	Condiciones de reacción	Tiempo de mantenimiento (h)	Temp. de mantenimiento (ºC)	Resultados/ conclusión
5 g	Agua, 70-75ºC, 24 h	24	23-25	Polimorfo B
1 g de Polimorfo B	Agua, 70-75ºC, 24 h	48	23-25	Polimorfo E
2 g	Agua, 40 ml	16	23-25	Polimorfo E
150 g	Agua, 3,0 l	24	23-25	Polimorfo E
150 g	Agua, 3,0 l	48	23-25	Polimorfo E
10 g	Agua, 100 ml, 24 h, 75ºC	18	23-25	Polimorfo B
10 g	Agua, 100 ml, 24 h, 75ºC	18	40	Polimorfo B
10 g	Agua, 200 ml, 24 h, 75ºC	14	-5	Mezcla
10 g	Agua, 200 ml, 24 h, 75ºC	14	23-25	Polimorfo E
10 g	Agua, 200 ml, 24 h, 75ºC	14	40	Mezcla
10 g	Agua, 100 ml, 24 h, 75ºC	21	23-25	Polimorfo E
10 g	Agua, 100 ml, 24 h, 75ºC	21	40	Mezcla
10 g	Agua, 100 ml, 14 h, 75ºC	2	23-25	Mezcla

El tiempo de mantenimiento dio resultados mixtos, y se determinó que el material debe ser filtrado a 60-65 ºC y el material lavado con 0,5 volúmenes de agua caliente (50-60 ºC).

Tabla 4: Experimentos de Aumento a Escala

Cantidad	Cantidad de agua (l)	Temp. (ºC)	Tiempo (h)	Resultados/conclusión
100 g	1,0	75	6	Polimorfo B
100 g	1,0	75	22	Polimorfo B
100 g	1,0	75	6	Polimorfo B
100 g	1,0	75	24	Polimorfo B
100 g	1,0	75	6	Polimorfo B
100 g	1,0	75	22	Polimorfo B

Tabla 5: Estudios de Secado

Cantidad	Tiempo de Secado (h)	Temp. de Secado (ºC)	Vacío (mm de Hg)	KF § (%)	Resultados/conclusión
100 g	0	-	-	3,690	Polimorfo B
100 g	3	30	152	3,452	Polimorfo B
100 g	8	30	152	3,599	Polimorfo B
100 g	0	-	-	3,917	Polimorfo B
100 g	5	40	152	3,482	Polimorfo B
100 g	22	40	152	3,516	Polimorfo B
100 g	3	40	152	3,67	Polimorfo B
100 g	22	40	152	3,55	Polimorfo B
* Condiciones de reacción: Agua 1 l, 75 ºC, 22-24 h; §: Media de 2 medidas					

Los estudios de secado determinaron que el material debe ser secado a 35-40 ºC, 125-152 mm de Hg durante 3 a 22 h o hasta que el contenido de agua alcance ≤ 4% en peso.

Para una preparación a gran escala del polimorfo E (5222-152-B), se cargó un matraz de fondo redondo de 5 l con 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona (150 g, 0,579 mol) y agua (3000 ml, 20 vol). La mezcla se agitó mecánicamente a temperatura ambiente (23-25 ºC) durante 48 h en una atmósfera de nitrógeno.

Se tomaron muestras después de 24 h y 48 h antes de filtrar la muestra y secarla al aire en el filtro durante 1 h. El material se transfirió a una bandeja de secado y se secó a temperatura ambiente (23-25 ºC) durante 24 h. El análisis KF sobre el material secado mostró un contenido de agua de 11,9%. El material se remitió para análisis por XRPD, TGA, DSC y HPLC. Los análisis mostraron que el material era polimorfo E puro.

Para una preparación a gran escala del polimorfo B (5274-104), se cargó un matraz de fondo redondo de 3 cuellos, de 2 l, con 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona (mezcla de polimorfos, 100 g, 0,386 mol) y agua (1000 ml, 10 vol). La mezcla se calentó a 75 ºC a lo largo de aproximadamente 30 minutos con agitación mecánica en una atmósfera de nitrógeno.

Se tomaron muestras después de 6 h y 24 h antes de dejar enfriar la mezcla hasta 60-65 ºC, se filtró y el material se lavó con agua caliente (50-60 ºC) (50 ml, 0,5 vol). El material se transfirió a una bandeja de secado y se secó a 30 ºC, 152 mm Hg durante 8 h. El análisis KF sobre el material secado mostró un contenido de agua de 3,6%. Después de moler el material, se remitió para análisis por XRPD, TGA, DSC y HPLC. Los análisis mostraron que el material era polimorfo B puro. Los resultados de los análisis se muestran en las Figuras 32-46.

6.3 Medidas de difracción de rayos X en polvo

Los análisis de difracción de rayos X en polvo se llevaron a cabo en un difractómetro de rayos X en polvo Shimadzu XRD-6000 usando la radiación *Ka* del Cu. El instrumento está equipado con un tubo de rayos X de foco fino. El voltaje y amperaje del tubo se fijaron a 40 kV y 40 mA, respectivamente. Las rendijas de divergencia y dispersión se fijaron a 1º y la rendija receptora se fijó a 0,15 mm. La radiación difractada se detectó mediante un detector de escintilación de NaI. Se usó un barrido continuo theta-dos theta a 3 º/min (etapas de 0,4 s/0,02º) desde 2,5 grados 2θ hasta 40 grados 2θ. Se analizó un patrón de silicio cada día para comprobar la alineación del instrumento.

Los análisis de difracción de rayos X en polvo también se llevaron a cabo usando la radiación *Ka* del Cu en un

difractómetro Inel XRG-3000 equipado con un detector curvado sensible a la posición. Los datos se recogieron en tiempo real a lo largo de un intervalo theta-dos theta de 120º a una resolución de 0,03º. El voltaje y corriente del tubo fueron 40 kV y 30 mA, respectivamente. Se analizó un patrón de silicio cada día para comprobar la alineación del instrumento. En las figuras sólo se muestra la región entre 2,5 y 40 grados 2θ.

6.4. Análisis térmico

Los análisis TG se llevaron a cabo en un instrumento de TA Instruments TGA 2050 o 2950. Los patrones de calibración fueron níquel y alumel. Se pusieron aproximadamente 5 mg de la muestra en un recipiente, pesado de manera exacta, y se insertó en el horno TG. Las muestras fueron calentadas en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de 10 ºC/min, hasta una temperatura final de 300 o 350 ºC.

Los datos DSC se obtuvieron en un instrumento TA 2920. El patrón de calibración fue indio. Se pusieron muestras de aproximadamente 2-5 mg en un recipiente de DSC y se registró el peso de manera exacta. Se usaron para el análisis recipientes ondulados con un pequeño orificio, y las muestras se calentaron en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de 10 ºC/min, hasta una temperatura final de 350 ºC.

La microscopía de platina caliente se llevó a cabo usando una platina caliente Kofler en un microscopio Leica. El instrumento se calibró usando estándares de USP.

Para los experimentos de TG-IR se utilizó un TGA 2050 de TA Instruments interconectado con un espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Nicolet modelo 560, equipado con una fuente Globar, divisor de rayos XT/KBr, y detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS). El espectrómetro IR se calibró en longitud de onda con poliestireno en el día de uso, mientras que la TG se calibró en temperatura y peso bisemanalmente, usando indio para la calibración de temperatura. Una muestra de aproximadamente 10 g de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona se pesó en un recipiente de aluminio y se calentó de 25 a 30 ºC hasta 200 ºC a una velocidad de 20 ºC/min con una purga de helio. Los espectros de IR se obtuvieron en series, representando cada espectro 32 barridos co-añadidos a una resolución de 4 cm^{-1}. Los espectros se recogieron con un tiempo de repetición de 17 segundos. Los datos del análisis TG/IR se presentan como representaciones gráficas de Gram-Schmidt y los espectros IR relacionados con el tiempo. Las representaciones gráficas de Gram-Schmidt muestran la intensidad IR total frente al tiempo; de ahí que los volátiles puedan ser identificados en cada punto de tiempo. También muestran cuándo se detectan los volátiles. A partir de las representaciones gráficas de Gram-Schmidt, se seleccionaron puntos de tiempo y los espectros IR de estos puntos de tiempo se presentan en los espectros relacionados apilados. Cada espectro identifica los volátiles que se desprenden en ese punto de tiempo. Los volátiles fueron identificados a partir de una búsqueda de la librería espectral en fase de vapor del RH Nicolet TGA. Los resultados de concordancia de la librería también se presentan para mostrar el vapor identificado.

6.5 Medidas de espectroscopía

Los espectros Raman se adquirieron en un espectrómetro Raman de transformada de Fourier Nicolet modelo 750 utilizando una longitud de onda de excitación de 1064 nm y aproximadamente 0,5 W de energía láser de Nd:YAG. Los espectros representan 128 a 256 barridos co-añadidos adquiridos a una resolución de 4 cm^{-1}. Las muestras se prepararon para el análisis poniendo el material en un contenedor de muestras y posicionando este en el espectrómetro. El espectrómetro se calibró en longitud de onda usando azufre y ciclohexano en el momento de uso.

Los espectros de IR medio se adquirieron en un espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Nicolet modelo 860 equipado con una fuente Globar, divisor de rayos XT/KBr y un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). Se utilizó para el muestreo un accesorio de reflectancia difusa Spectra-Tech, Inc. cada espectro representa 128 barridos co-añadidos a una resolución espectral de 4 cm^{-1}. Se adquirió un juego de datos de fondo con un espejo de alineación en el lugar. Después se adquirió un juego de datos de muestra de rayo único. Posteriormente, se adquirió un espectro de log 1/R (donde R = reflectancia) relacionando los dos juegos de datos uno contra el otro. El espectrofotómetro se calibró (longitud de onda) con poliestireno en el momento de uso.

6.6. Medidas de sorción/desorción de humedad

Los datos de sorción/desorción de la humedad se recogieron en un sistema de equilibrio de humedad VTI SGA-100. Para los isotermos de sorción, se usó para el análisis un intervalo de sorción de 5 a 95 % de humedad relativa (RH) y un intervalo de desorción de 95 a 5 % de RH en incrementos de RH de 10%. La muestra no se secó antes del análisis. Los criterios de equilibrio usados para el análisis fueron menos que 0,0100 por ciento en peso de cambio en 5 minutos con un tiempo de equilibrado máximo de 3 horas si el criterio de peso no se cumplió. Los datos no fueron corregidos para el contenido de humedad inicial de las muestras.

6.7. Medidas de NMR de protones en disolución

Se recogieron espectros NMR no reportados previamente en SSCI, Inc., 30365 Kent Avenue, West Lafayette, Indiana. Los espectros ^{1}H NMR en fase de disolución se adquirieron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker modelo AM. El espectro de ^{1}H NMR represente 128 transientes co-añadidos recogidos con un pulso de 4 µs y un tiempo de retardo de relajación de 5 segundos. El decaimiento de inducción libre (FID) fue multiplicado

exponencialmente con un factor de ensanchamiento de línea Lorentziano de 0,1 Hz para mejorar la relación señal a ruido. El espectro NMR se procesó utilizando el software GRAMS, versión 5.24. Las muestras se disolvieron en dimetilsulfóxido-*d6*.

El alcance de esta invención puede ser entendido con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

6.8. Estudios de disolución intrínseca y solubilidad

Se realizaron experimentos de disolución intrínseca sobre la Forma A (anhidra), la Forma B (hemihidrato), y la Forma E (dihidrato) de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Se realizaron experimentos de solubilidad de equilibrio sobre las Formas A y B. Se analizaron alícuotas por espectrometría ultravioleta-visible, y los sólidos que quedaron de cada experimento se analizaron por difracción de rayos X en polvo (XRPD).

6.8.1. Parte experimental

6.8.1.1 Disolución

Los experimentos de disolución se llevaron a cabo en un aparato de disolución VanKel VK6010-8 equipado con un calentador/circulador VK650A. Se usó un aparato de disolución intrínseca (aparato de Woods). Se comprimieron las muestras a 1,5 toneladas métricas durante 1 min usando el aparato de Woods en una prensa hidráulica, dando una superficie de muestra de 0,50 cm^2. Se usó para cada experimento un medio de disolución que consistía en 900 ml de tampón HCl, pH 1,8, con laurilsulfato de sodio al 1%. El medio se desgasificó por filtración a vacío a través de un disco de filtro de nylon de 0,22 µm y se mantuvo a 37 ºC. El aparato fue rotado a 50 rpm para cada experimento. Se filtraron alícuotas inmediatamente usando filtros de jeringa de 0,2 µm. En algunos casos, los sólidos no disueltos se recuperaron y analizaron por difracción de rayos X en polvo (XRPD).

6.8.1.2. Solubilidad

Se realizaron experimentos de solubilidad en equilibrio en un matraz de fondo redondo de tres cuellos, de 100 ml, sumergido en un baño de aceite de temperatura constante a 25 ºC. Se agitó una muestra sólida de 400-450 mg en 50 ml de medio de disolución (tampón HCl, pH 1,8, con laurilsulfato de sodio al 1%) usando una varilla de agitación mecánica. Se filtraron alícuotas usando filtros de jeringa de 0,2 µm e inmediatamente se diluyeron 1 ml → 50 ml, después 5 ml → 25 ml, con medio de disolución en un recipiente de vidrio, un factor de dilución final de 250.

6.8.1.3. Espectrofotometría UV-Vis

Se analizaron disoluciones de muestra de disolución y solubilidad mediante un espectrofotómetro de rayo único Beckman DU 640. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1.000 cm y una longitud de onda de análisis de 228,40 nm. El detector fue puesto a cero con una cubeta llena de medio de disolución.

6.8.1.4 Difracción de rayos X en polvo

Los análisis XRPD se llevaron a cabo en un difractómetro de rayos X en polvo Shimadzu XRD-6000 usando la radiación Kα del Cu. El instrumento está equipado con un tubo de rayos X de foco fino. Se fijó la energía y amperaje del tubo a 40 kV y 40 mA, respectivamente. Las rendijas de divergencia y dispersión se fijaron a 1º y la rendija receptora se fijó a 0,15 mm. La radiación difractada se detectó mediante un detector de escintilación de NaI. Se usó un barrido continuo theta-dos theta a 3 º/min (etapas de 0,4 s/0,02º) desde 2,5 hasta 40 grados 2θ. Se analizó un patrón de silicio cada día para comprobar la alineación del instrumento. Las muestras se empaquetaron en un contenedor de aluminio con inserto de silicio.

6.8.2. Resultados

Los resultados de estos estudios de solubilidad intrínseca se resumen en la Tabla 6. Tanto los experimentos de solubilidad como de disolución se realizaron en un medio de tampón HCl, pH 1,8, que contenía laurilsulfato de sodio al 1%. Se encontró que la Forma A era inestable en el medio, convirtiéndose en la Forma E. Se estimó que las solubilidades de las Formas A, B y E eran 6,2, 5,8 y 4,7 mg/ml, respectivamente. Se estimó que las velocidades de disolución de las Formas A, B y E eran 0,35, 0,34 y 0,23 mg/ml, respectivamente.

6.8.2.1 Desarrollo del método de espectrofotometría UV-Vis

Se hizo un barrido UV-Vis del medio de disolución (establecido como blanco con una cubeta vacía) para identificar cualesquiera picos interferentes. Estuvo presente un pico pequeño a 225 nm, como se muestra en la Figura 47.

Se analizaron disoluciones de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona a concentraciones variantes por espectrofotometría UV-Vis. Se hizo un barrido preliminar de una disolución de 1,0 mg/ml, con el instrumento llevado al blanco con medio de disolución. La disolución fue ligeramente absorbente y ruidosa entre 200 280 nm, haciendo necesaria una dilución.

Después se hizo un barrido a una disolución de 0,04 mg/ml de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-

2,6-diona entre 200 - 300 nm. La representación gráfica era aún ruidosa entre 200 y 230 nm, como se muestra en la Figura 48. Se diluyó adicionalmente la muestra hasta 0,08 mg/ml. Un barrido de longitudes de onda entre 200 - 350 nm para esta muestra mostró un pico a 228,4 nm, sin interferencia, como se muestra en la Figura 49. Por tanto, se eligió una longitud de onda de 228,4 nm para el análisis de la solubilidad y disolución de las muestras.

Se generó una curva de calibración de seis puntos con patrones de las siguientes concentraciones: 0,001 mg/ml, 0,002 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,010 mg/ml, 0,015 mg/ml y 0,020 mg/ml (Cuaderno de notas 569-90). Se obtuvo un coeficiente de linealidad de R^2 = 0,9999, como se muestra en la Figura 50.

6.8.2.2 Solubilidad

Se suspendió una muestra que consistía en 449,4 mg de la Forma A en medio de disolución. No se controló el tamaño de partícula. Se tomaron alícuotas a 7, 15, 30, 60, 90 y 150 min. La concentración alcanzó 6,0 mg/ml en el primer punto de tiempo. La concentración más alta alcanzada fue 6,2 mg/ml, a 30 min. Desde ese punto las concentraciones disminuyeron, alcanzando 4,7 mg/ml a 150 min como se muestra en la Figura 51. Los sólidos que quedaron en el punto de tiempo final se analizaron por XRPD y se encontró que eran la Forma E, como se muestra en la Tabla 7. No se pueden ver picos atribuidos a la Forma A en el patrón. Dado que la concentración no se estabilizó a 4,7 mg/ml, la solubilidad de la Forma E puede ser más baja que esa.

Se suspendió una muestra que consistía en 401,4 mg de Forma B en medio de disolución. No se controló el tamaño de partícula. Se tomaron alícuotas a 7, 15, 30, 60, 960, 180, 420 y 650 min. La Forma B se disolvió mucho más lentamente que la Forma A, alcanzando 3,3 mg/ml en 90 min. La concentración se estabilizó a 5,6 – 5,7 mg/ml en los tres puntos de tiempo finales como se ve en la Figura 52. Se mostró que los sólidos que quedaron eran Forma B como se ve en la Tabla 7, sugiriendo que la Forma B tiene buena estabilidad en agua.

Se da un resumen de las solubilidades en la Tabla 6. Las cantidades disueltas en cada punto de tiempo se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 6: Resumen de Resultados

Forma	Solubilidad	Disolución intrínseca #1	Disolución intrínseca #2	Velocidad media de disolución intrínseca
Forma A	6,2 mg/ml	0,35	0,22[a]	0,29[a]
Forma B	5,8 mg/ml	0,35	0,32	0,34
Forma E	4,7 mg/ml	0,21	0,25	0,23
a. El experimento de disolución de la Forma A #2 puede haberse convertido en la Forma E sobre la superficie del disco, sesgando la velocidad media a más baja.				

Tabla 7: Detalles Experimentales

Experimento	Forma Final
Forma A prensada	A
Forma B prensada	B
Solubilidad de la Forma A	E
Solubilidad de la Forma B	B
Disolución de la Forma A	-
Disolución de la Forma A	A
Disolución de la Forma B	-
Disolución de la Forma B	B
Disolución de la Forma E	E
Disolución de la Forma E	-

Tabla 8: Solubilidad de la Forma A

Punto de tiempo (min)	Concentración (mg/ml)
7	6,00
15	6,11
30	6,16
60	6,10
90	5,46
150	4,73

Tabla 9: Solubilidad de la Forma B

Punto de tiempo (min)	Concentración (mg/ml)
7	1,63
15	2,14
30	2,33
60	2,94
90	3,34
180	5,67
420	5,76
650	5,61

6.8.2.3 Disolución intrínseca

Aproximadamente 200 mg de cada una de las Formas A y B se comprimieron en discos en el aparato de Woods usando 2 toneladas métricas de presión. Posteriormente las muestras se rasparon, se molieron suavemente y se analizaron por XRPD. El estudio mostró que la compresión y molienda no causa un cambio de forma en ninguno de los casos. (Véase la Tabla 7).

Se realizaron dos ejecuciones de disolución preliminares. Se fracturaron los discos hasta cierto punto en ambos experimentos, comprometiendo el requerimiento de área superficial constante.

El primer experimento de disolución intrínseca que siguió estrictamente el capítulo de USP sobre disolución intrínseca utilizó aproximadamente 150 mg de cada una de las Formas A y B. Se tomaron siete alícuotas, empezando a 5 min y terminando a 90 min, para mantener las condiciones de sedimentación. El experimento dio como resultado perfiles de disolución lineales, con una velocidad de 0,35 mg por cm^2 por minuto para ambas formas. El experimento de la Forma E se hizo más tarde bajo las mismas condiciones, y se añadió al gráfico para comparación. (Véase la Figura 53). La velocidad de disolución de la Forma E fue 0,21 mg por cm^2 por minuto, significativamente más baja que la velocidad de disolución de las Formas A y B. Esto está en línea con las expectativas basadas en los datos de solubilidad. La forma cristalina de los sólidos que quedaron no cambió en ningún caso.

El segundo experimento utilizó aproximadamente 250 mg de cada una de las Formas A y B. El experimento de la Forma E (135 mg) se hizo más tarde y se añadió al gráfico para comparación. (Véase la Figura 54). Se tomaron nueve alícuotas, empezando a 5 min y terminando a 150 min. Las velocidades de disolución fueron 0,22, 0,32 y 0,25 mg por cm^2 por minuto, respectivamente, para las Formas A, B y E. La velocidad de disolución para la Forma A en este experimento fue baja, mientras que las velocidades para las Formas B y E fueron similares a las encontradas en el primer experimento. Se cree que, en este caso, una fina capa del disco de la Forma A puede haberse convertido en la Forma E tras la exposición al agua. Esto es apoyado por la evidencia de la rápida conversión de la Forma A en la Forma E en el experimento de solubilidad. El patrón de difracción de los sólidos no disueltos no indica un cambio de forma. Sin embargo, el grueso del disco de la muestra no es expuesto al agua. Por lo tanto, se cree que la velocidad de disolución intrínseca real de la Forma A es cercana a 0,35 mg por cm^2 por minuto. Estaba disponible una insuficiente cantidad de Forma A para repetir el experimento.

Se da un resumen de las velocidades de disolución intrínseca en la Tabla 6. Las cantidades disueltas en cada punto de tiempo se resumen en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10: Resultados del Experimento de Disolución Intrínseca nº 1

Punto de tiempo	Forma A [a]	Forma B [a]	Forma E [a]
5 min	5,76	10,80 [b]	2,70
10 min	7,73	6,85	4,13
20 min	11,31	10,25	6,96
30 min	15,59	14,35	9,60
45 min	21,98	20,57	12,57
60 min	27,11	25,70	15,16
90 min	34,17	34,34	20,82
a. Los resultados se reportan como Cantidad acumulativa Disuelta por Unidad de Área (mg/cm^2)			
b. Este punto de datos no está incluido en la gráfica, dado que el valor es más alto que los siguientes dos puntos de datos.			

Tabla 11: Resultados del Experimento de Disolución Intrínseca nº 2

Punto de tiempo	Forma A [a]	Forma B [a]	Forma E [a]
5 min	4,50	5,04	3,06
10 min	5,22	6,12	4,31
20 min	7,54	7,73	11,40
30 min	11,46	12,72	11,93
45 min	15,01	17,33	14,72
60 min	18,38	21,93	18,52
90 min	24,38	31,64	26,24
120 min	30,35	41,31	33,56
150 min	35,26	49,54	40,82
a. Los resultados se reportan como Cantidad acumulativa Disuelta por Unidad de Área (mg/cm^2)			

6.9. Análisis de mezclas de polimorfos

Esta invención engloba mezclas de polimorfos diferentes. Por ejemplo, un análisis por difracción de rayos X de una muestra de producción dio un patrón que contenía dos pequeños picos vistos a 12,6º y 25,8º 2θ además de los representativos de la Forma B. A fin de determinar la composición de esa muestra, se realizaron las siguientes etapas:

1) Emparejamiento del nuevo patrón de producción con formas conocidas junto con excipientes farmacéuticos y contaminantes comunes;

2) Análisis de conglomerados de los picos adicionales para identificar si alguna fase desconocida está mezclada con la Forma B original;

3) Análisis armónico de los picos adicionales para identificar si puede estar presente alguna orientación preferida o si puede haber ocurrido algún cambio en el hábito cristalino; y

4) Indexado de las celdas unitarias tanto para la Forma B como la muestra de nueva producción para identificar cualesquiera relaciones cristalográficas posibles.

En base a estos ensayos, que pueden ser adaptados para el análisis de cualquier mezcla de polimorfos, se determinó que la muestra contenía una mezcla de las formas polimórficas B y E.

6.10. Forma de dosificación

La Tabla 12 ilustra una formulación de lote y una formulación de dosificación única para una unidad de dosis única

de 25 mg de una forma polimórfica de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona.

Tabla 12: Formulación para una cápsula de 25 mg

Material	**Porcentaje en peso**	**Cantidad (mg/comprimido)**	**Cantidad (kg/lote)**
Forma polimórfica de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona	40,0%	25 mg	16,80 kg
Almidón de maíz pregelatinizado, NF	59,5%	37,2 mg	24,99 kg
Estearato de magnesio	0,5%	0,31 mg	0,21 kg
Total	100,0%	62,5 mg	42,00 kg

Los componentes de almidón de maíz pregelatinizado (SPRESS B-850) y forma polimórfica de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona se hacen pasar a través de una criba (en este caso, una criba de 710 µm) y después se cargan en un Mezclador de Difusión con un inserto deflector y se mezclan durante aproximadamente 15 minutos. El estearato de magnesio se hace pasar a pasar a través de una criba (en este caso, una criba de 210 µm) y se añade al Mezclador de Difusión. Después, la mezcla es encapsulada en cápsulas usando una máquina de llenado de cápsulas de tipo Dosator.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona hemihidrato cristalina, que comprende las etapas de:

suspender 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en agua a una temperatura de 70ºC a 80ºC durante 6 a 24 horas;

filtrar 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona; y

secar 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona a vacio.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la suspensión se lleva a cabo con 10 volúmenes de agua.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la suspensión se lleva a cabo a una temperatura de 70ºC a 75ºC.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la filtración se lleva a cabo a una temperatura de 60ºC a 65ºC o a una temperatura de 65ºC a 75ºC.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el secado se lleva a cabo a una temperatura de 30ºC a 70ºC.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el secado se lleva a cabo a una temperatura de 35ºC a 40ºC o de 60ºC a 70ºC.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el secado se lleva a cabo a un vació de 125 mm de Hg a 152 mm de Hg.

8. Un procedimiento para preparar 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona dihidrato cristalina, que comprende las etapas de:

suspender 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en agua a temperatura ambiente;

filtrar 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona; y

secar 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la suspensión se lleva a cabo con 20 volúmenes de agua.

10. El procedimiento de la reivindicación 8 ó 9, en el que la suspensión se lleva a cabo a una temperatura de 23ºC a 25ºC.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el secado se lleva a cabo a una temperatura de 23ºC a 25ºC.

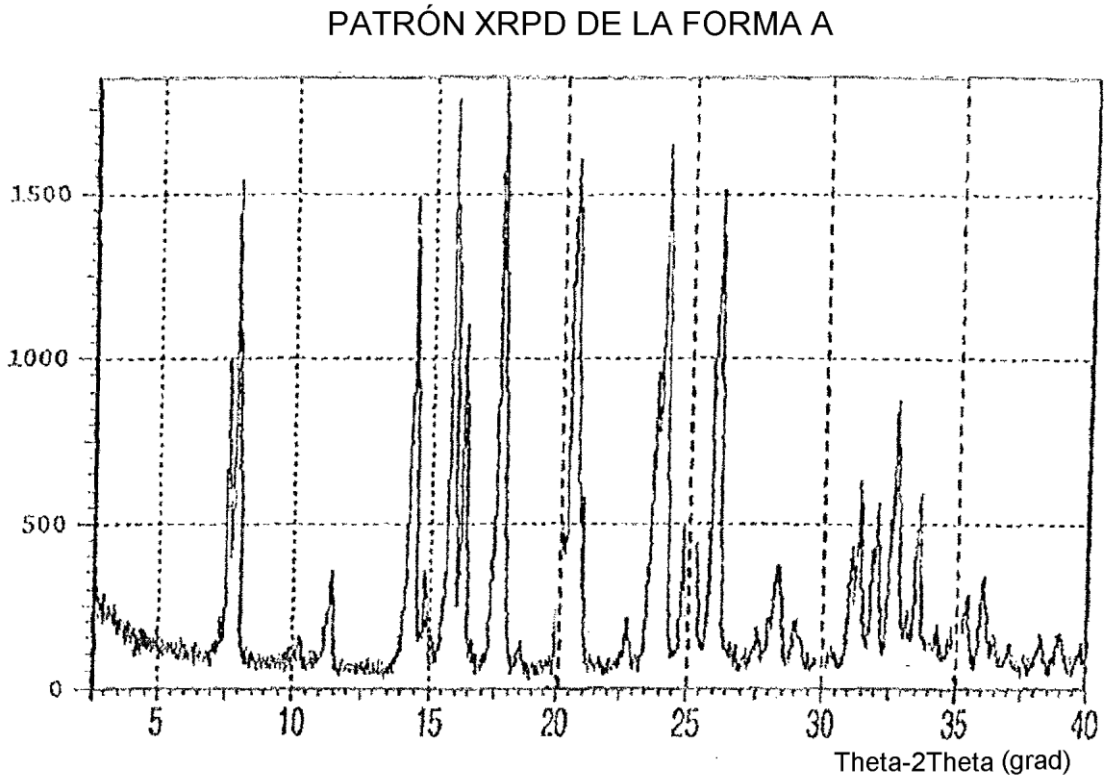

PATRÓN XRPD DE LA FORMA A
1.500
1.000
500
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 1

EXPECTRO IR DE LA FORMA A

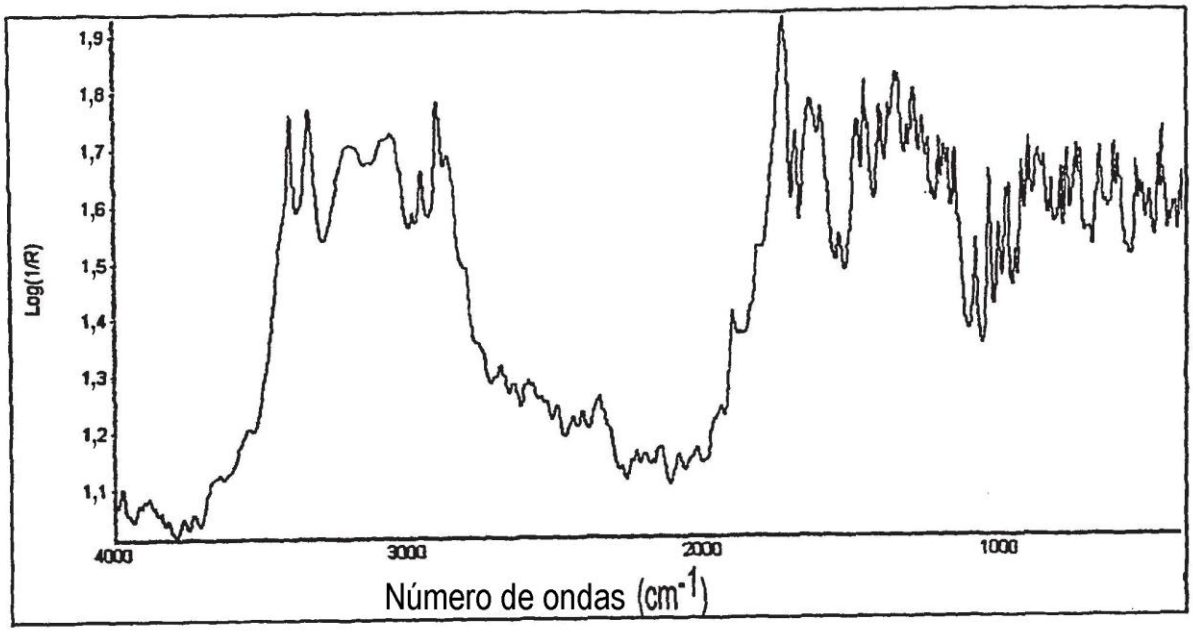


Fig. 2

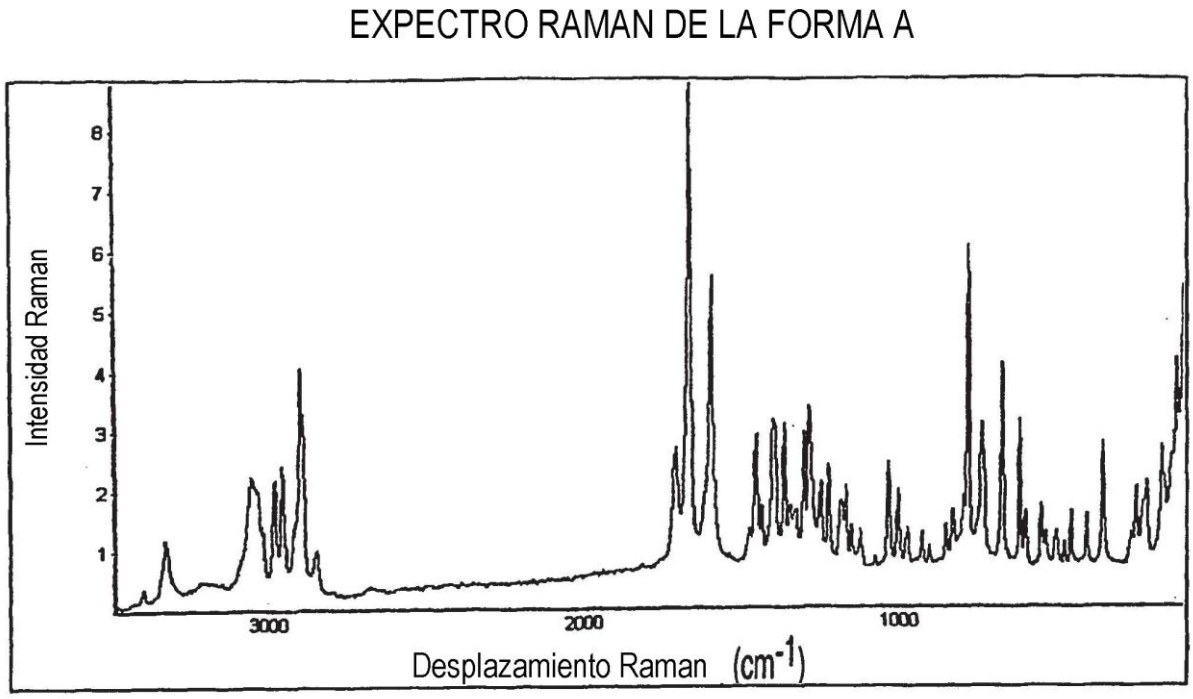

EXPECTRO RAMAN DE LA FORMA A
Intensidad Raman
8
7
6
5
4
3
2
1
3000
2000
1000
Desplazamiento Raman (cm-1)

Fig. 3

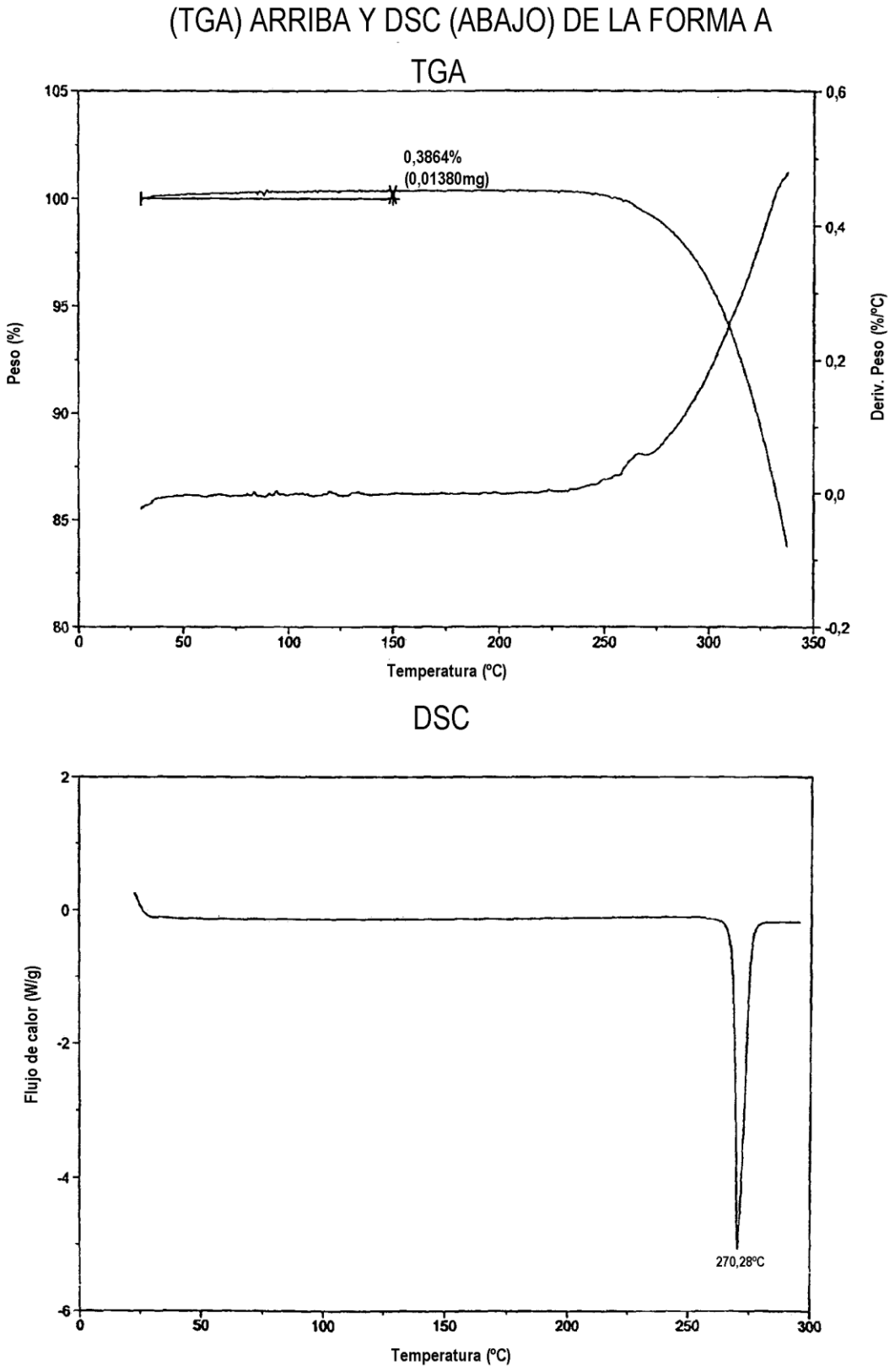

(TGA) ARRIBA Y DSC (ABAJO) DE LA FORMA A
TGA
0,3864%
(0,01380mg)
Peso (%)
Deriv. Peso (%/ºC)
Temperatura (ºC)
DSC
Flujo de calor (W/g)
270,28ºC
Temperatura (ºC)

Fig. 4

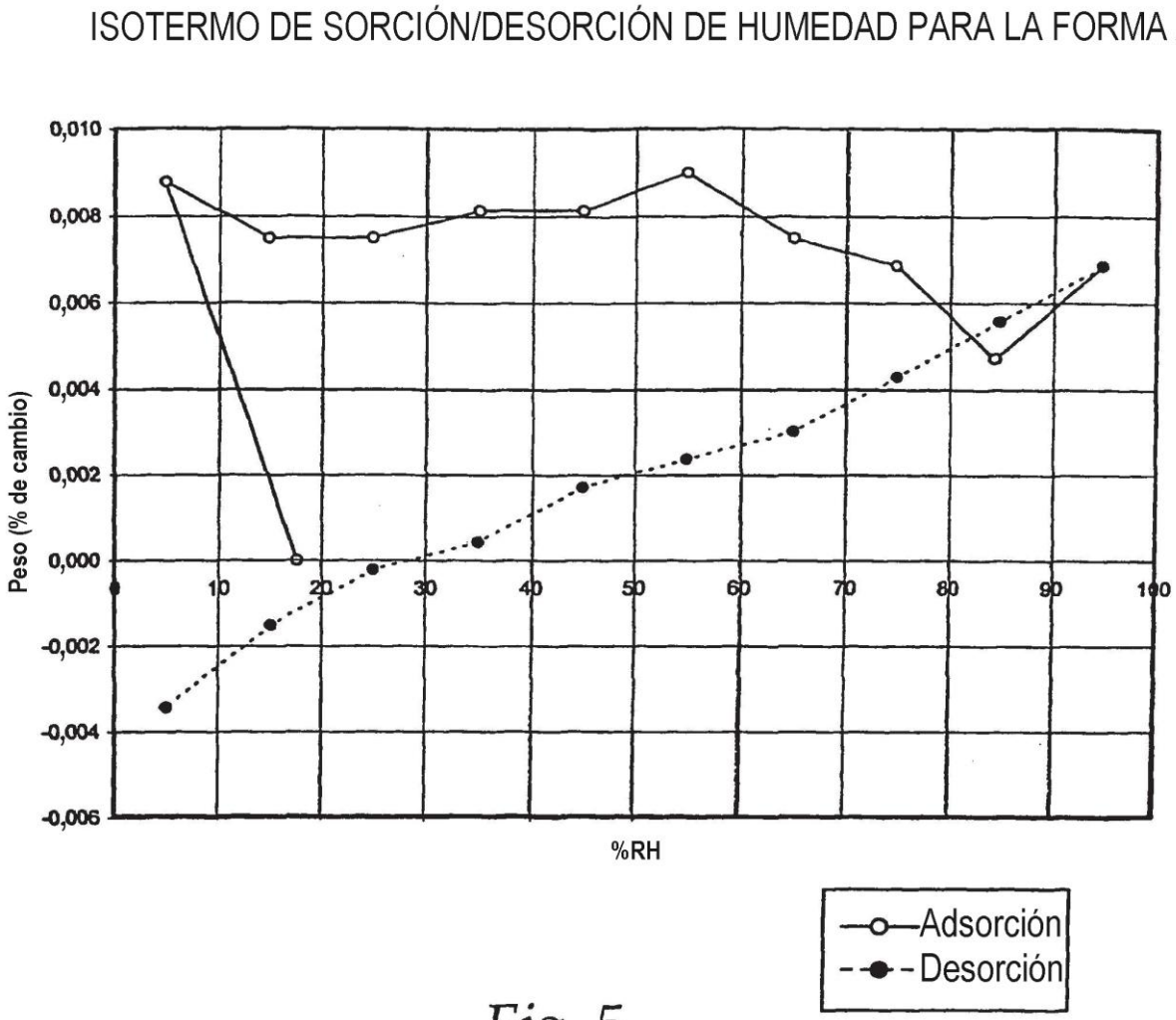

ISOTERMO DE SORCIÓN/DESORCIÓN DE HUMEDAD PARA LA FORMA A
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
-0,002
-0,004
-0,006
Peso (% de cambio)
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
%RH
Adsorción
Desorción

Fig. 5

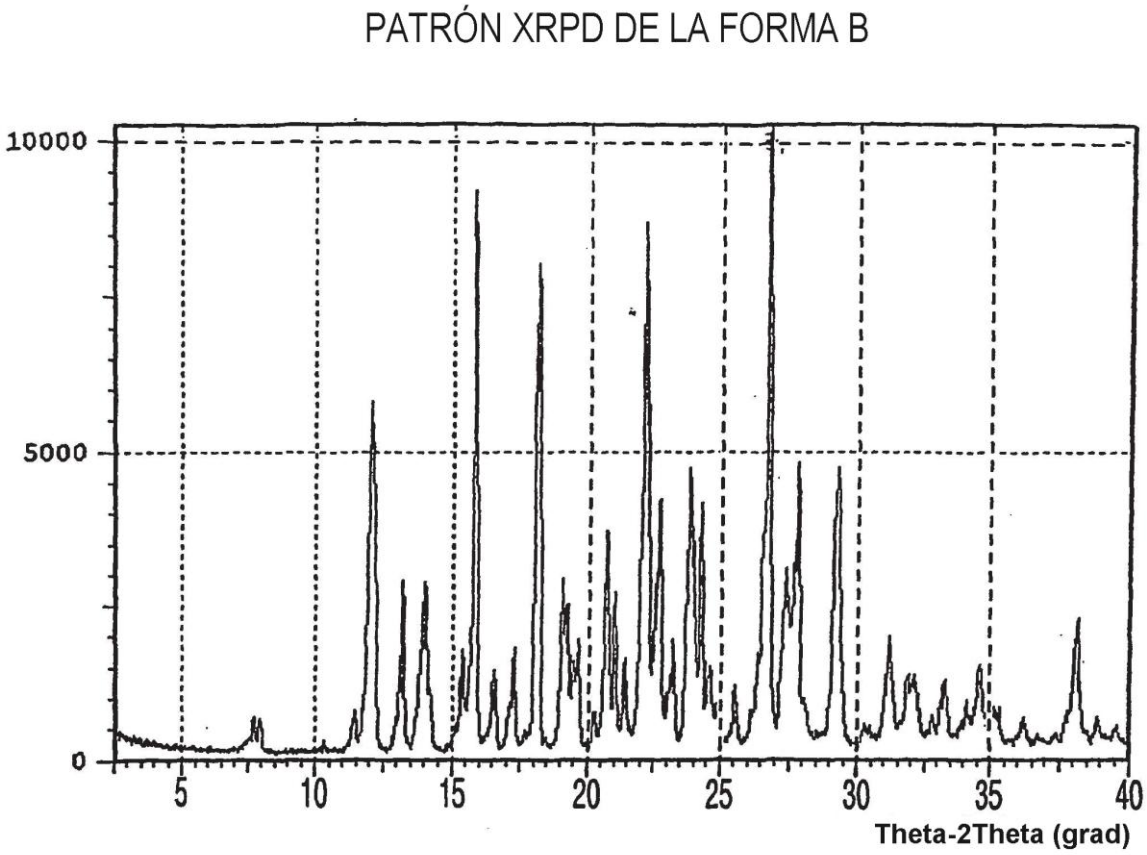

PATRÓN XRPD DE LA FORMA B
10000
5000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 6

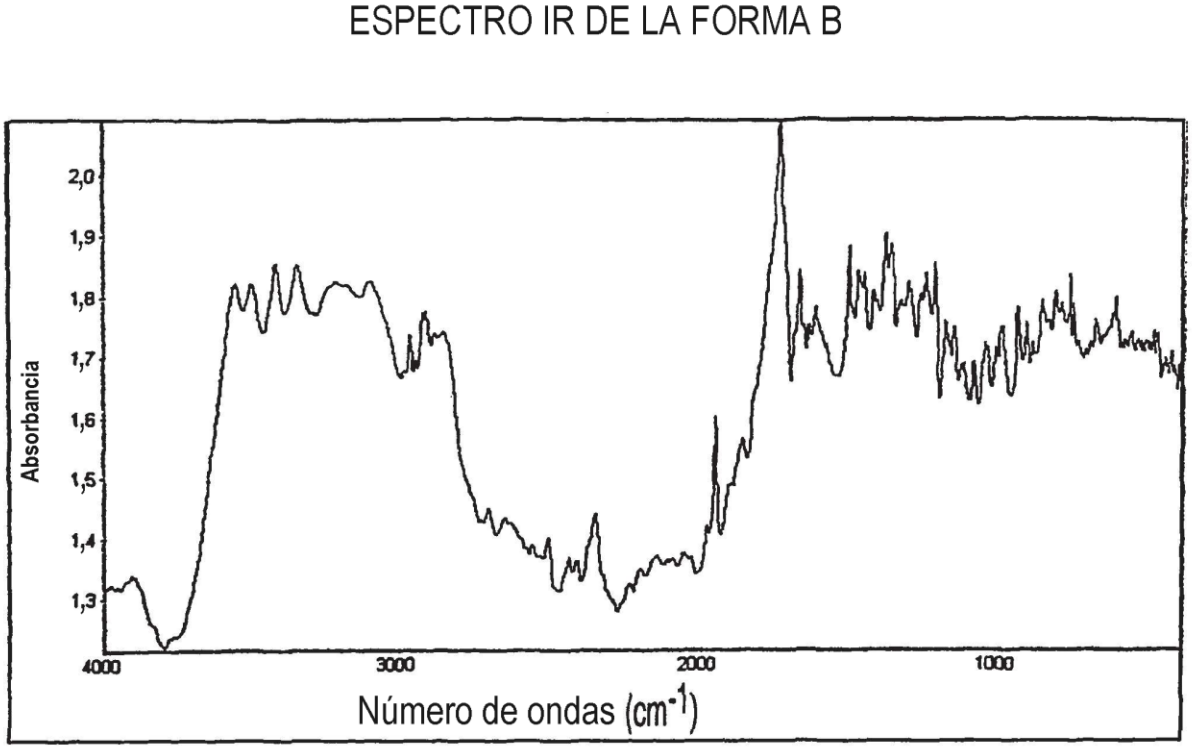

ESPECTRO IR DE LA FORMA B
Absorbancia
2,0
1,9
1,8
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
4000
3000
2000
1000
Número de ondas (cm-1)

Fig. 7

ESPECTRO RAMAN DE LA FORMA B

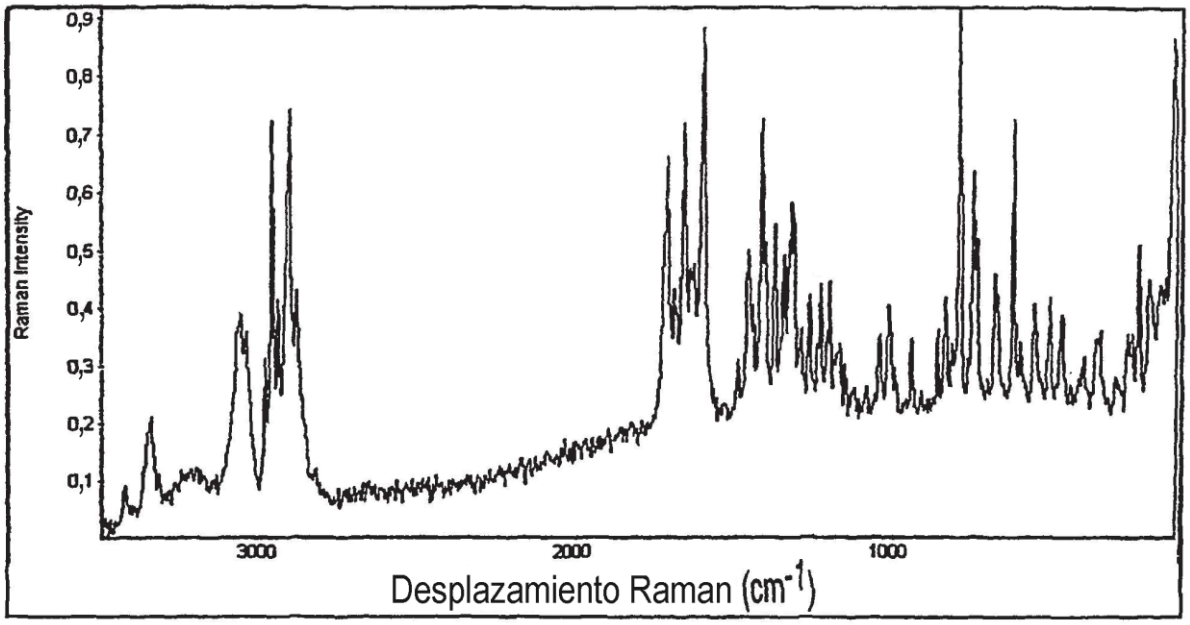


Fig. 8

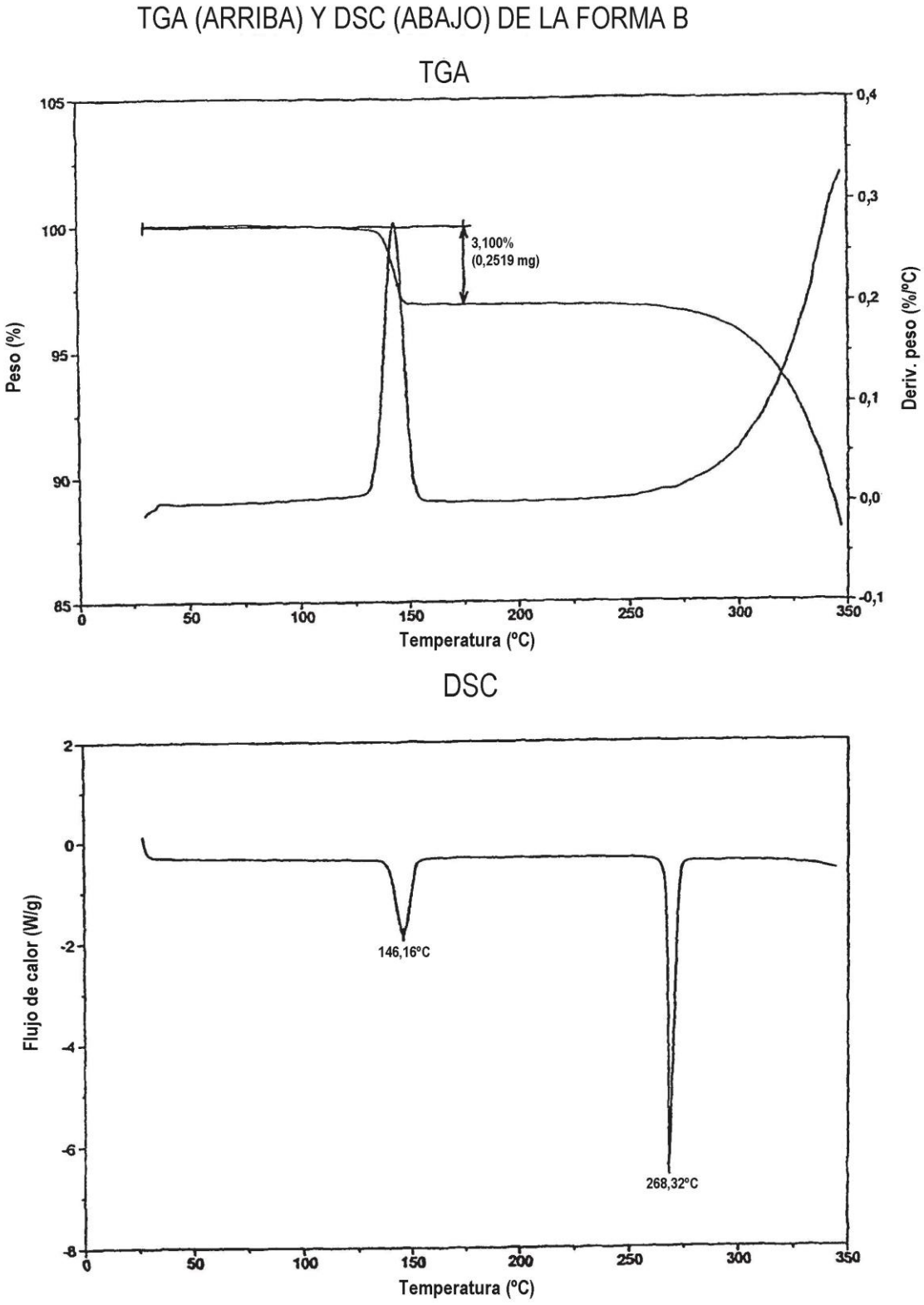

TGA (ARRIBA) Y DSC (ABAJO) DE LA FORMA B
TGA
Peso (%)
Deriv. peso (%/°C)
Temperatura (°C)
3,100%
(0,2519 mg)
DSC
Flujo de calor (W/g)
Temperatura (°C)
146,16°C
268,32°C

Fig. 9

RESULTADOS TG-IR PARA LA FORMA B

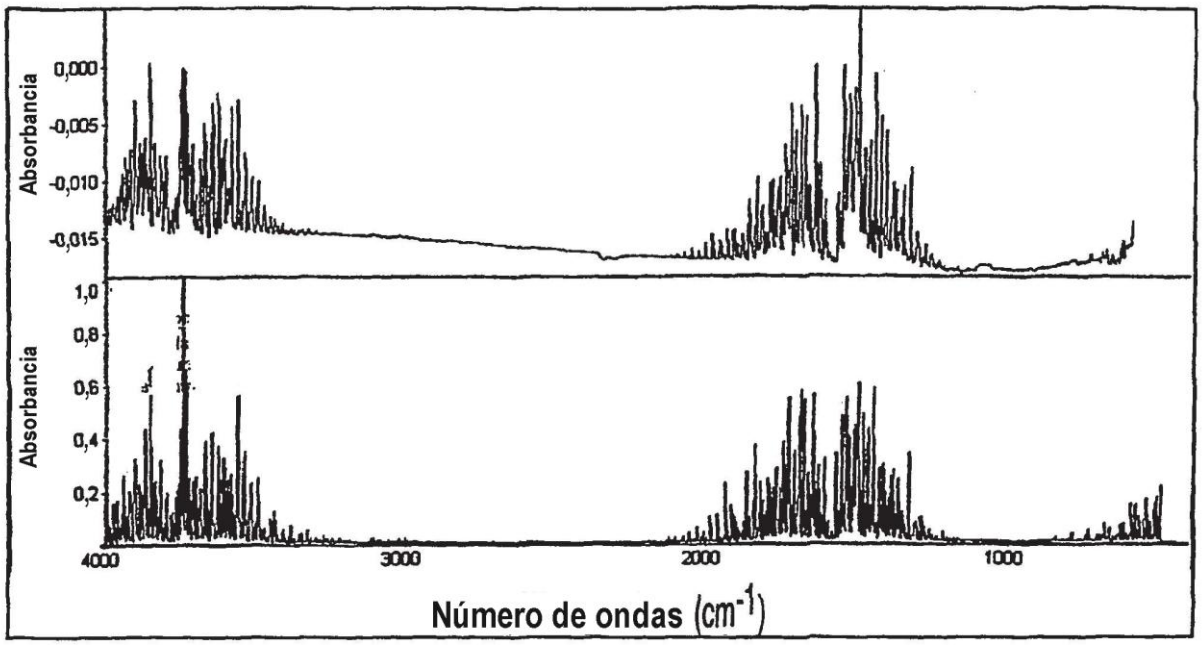


Fig. 10

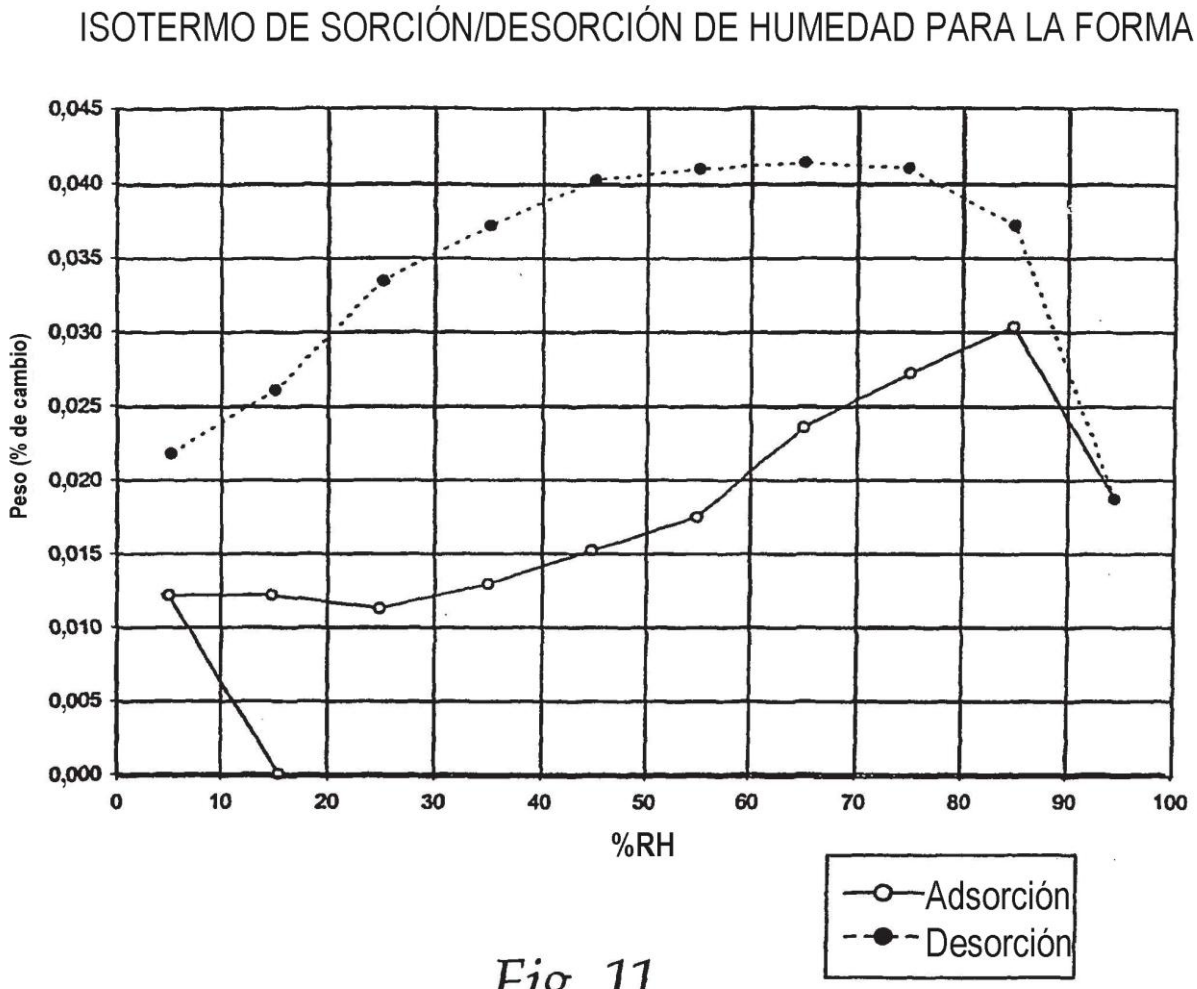

ISOTERMO DE SORCIÓN/DESORCIÓN DE HUMEDAD PARA LA FORMA B
Peso (% de cambio)
0,045
0,040
0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
%RH
Adsorción
Desorción

Fig. 11

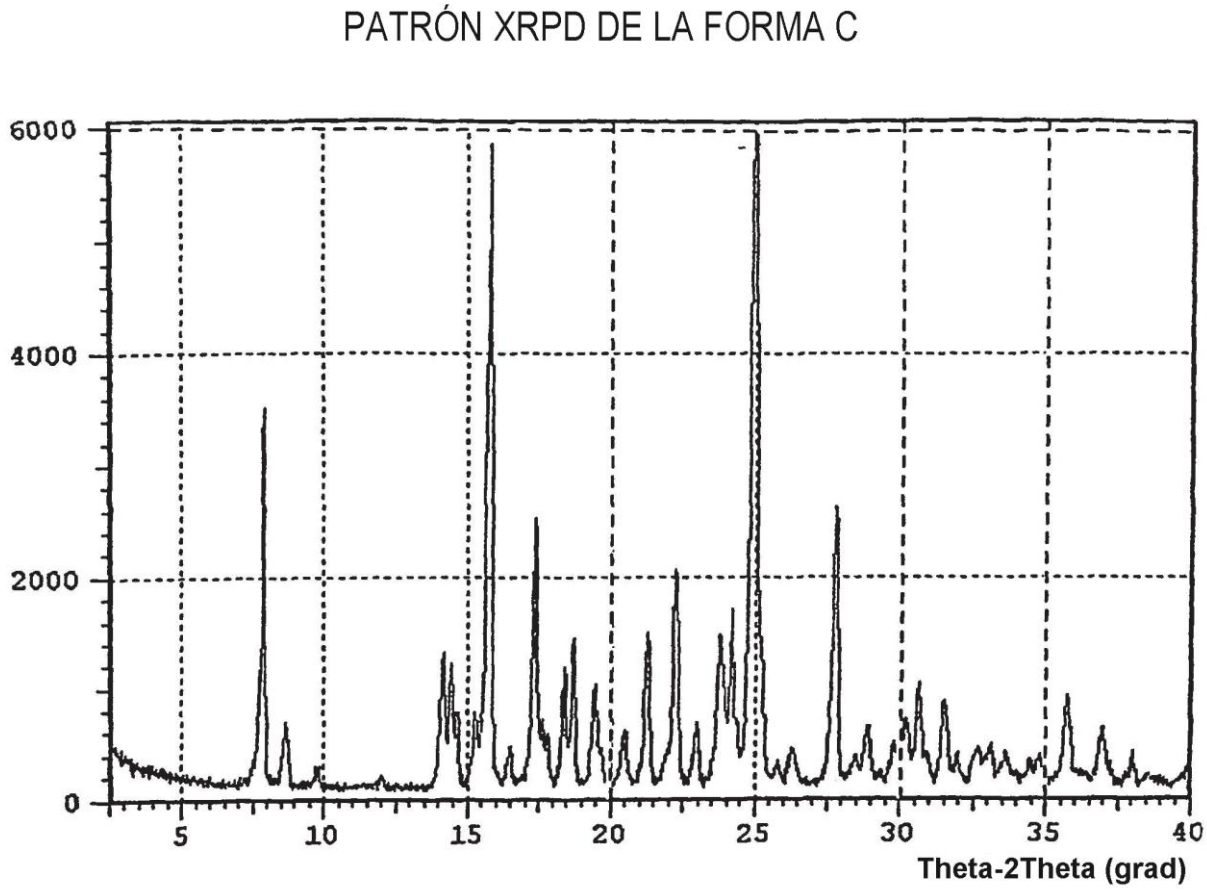

PATRÓN XRPD DE LA FORMA C
6000
4000
2000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 12

ESPECTRO IR DE LA FORMA C

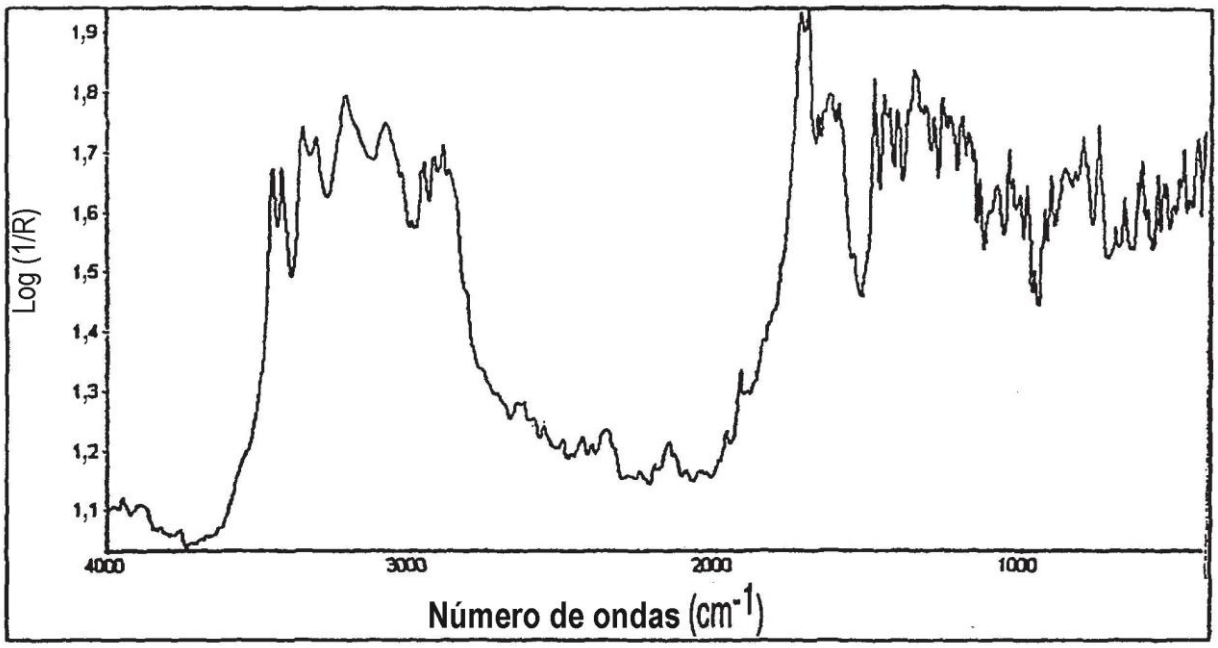


Fig. 13

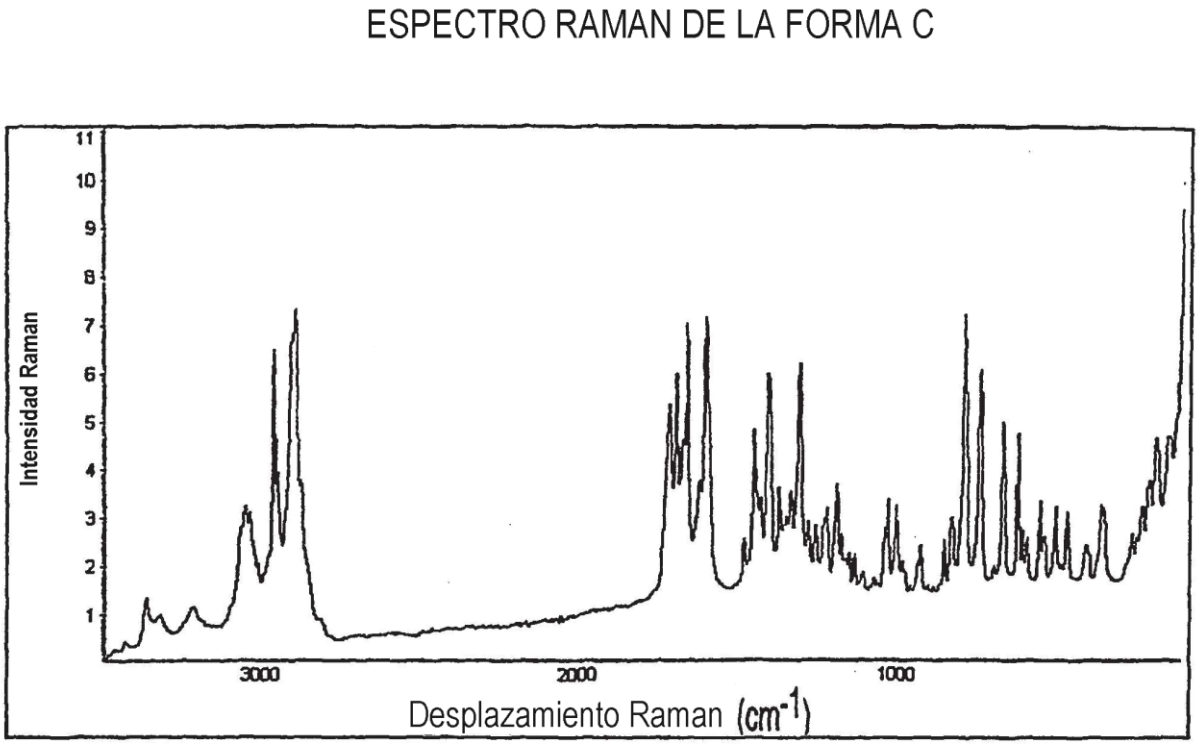

ESPECTRO RAMAN DE LA FORMA C
Intensidad Raman
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
3000
2000
1000
Desplazamiento Raman (cm-1)

Fig. 14

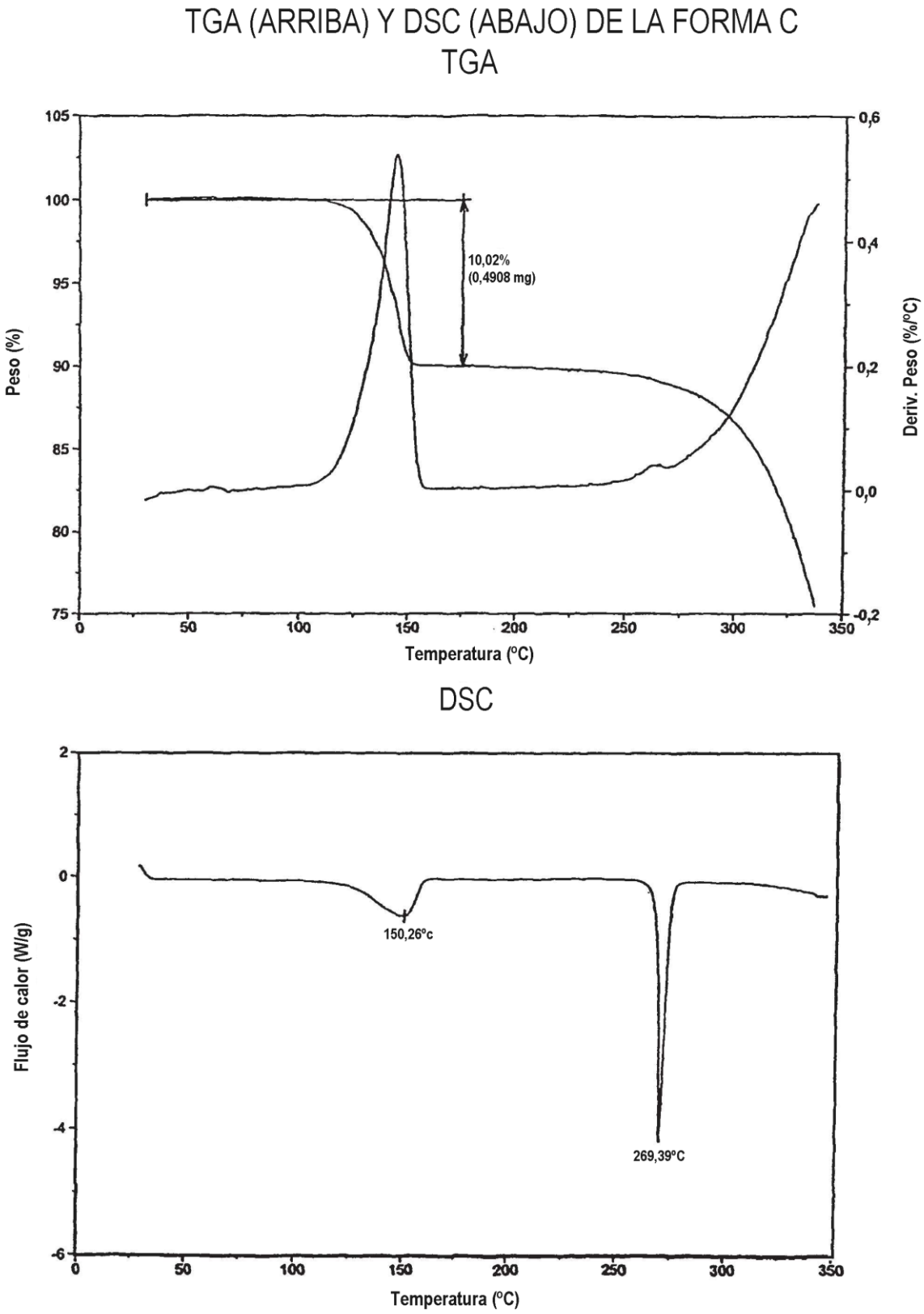

TGA (ARRIBA) Y DSC (ABAJO) DE LA FORMA C
TGA
Peso (%)
Deriv. Peso (%/°C)
Temperatura (°C)
10,02%
(0,4908 mg)
DSC
Flujo de calor (W/g)
Temperatura (°C)
150,26°c
269,39°C

Fig. 15

RESULTADOS TG-IR PARA LA FORMA C

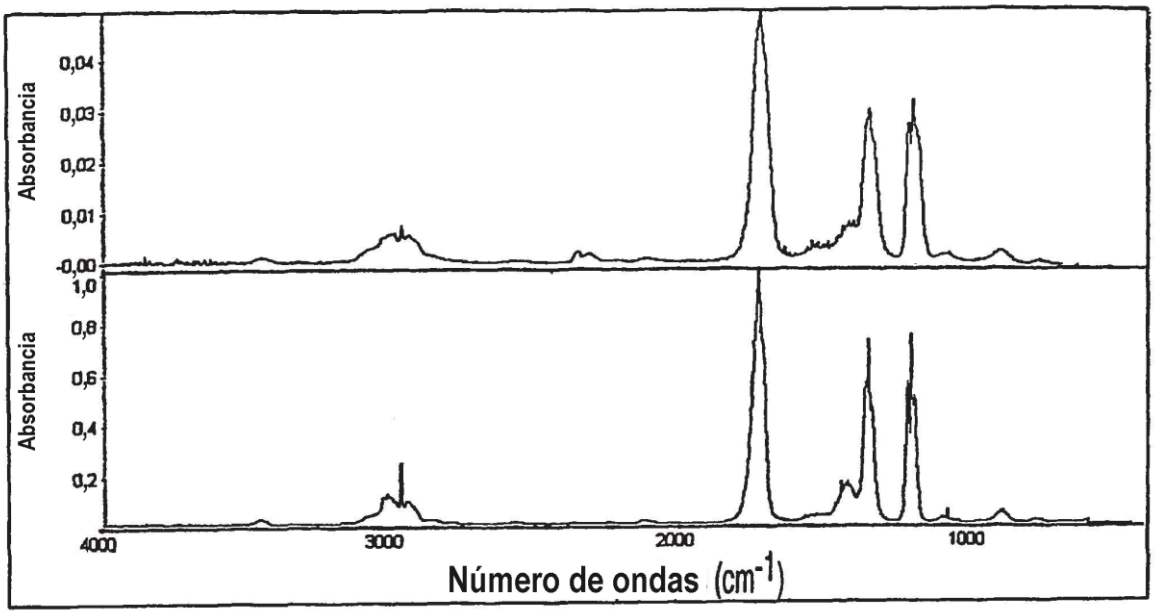


Fig. 16

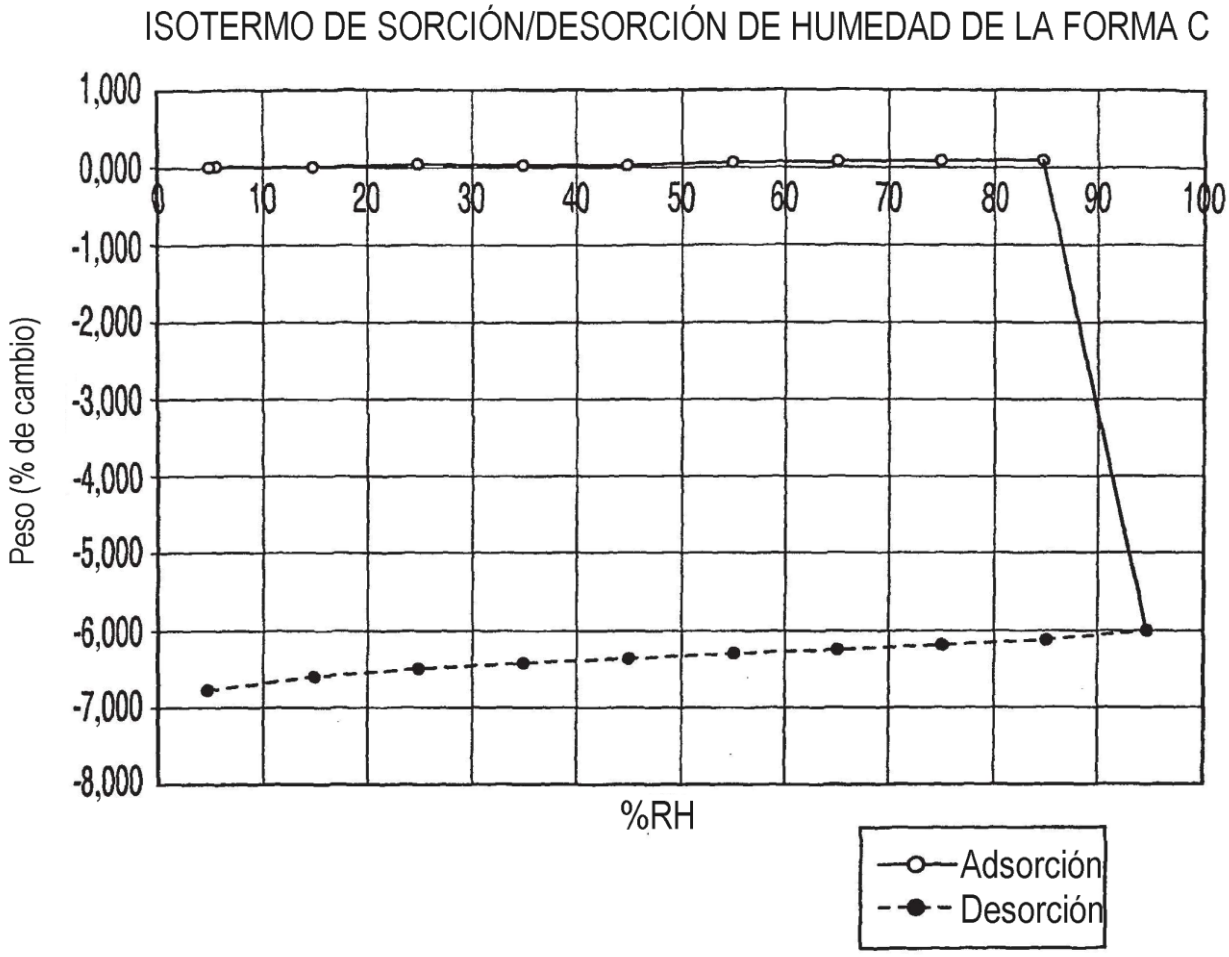

ISOTERMO DE SORCIÓN/DESORCIÓN DE HUMEDAD DE LA FORMA C
Peso (% de cambio)
1,000
0,000
-1,000
-2,000
-3,000
-4,000
-5,000
-6,000
-7,000
-8,000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
%RH
Adsorción
Desorción

Fig. 17

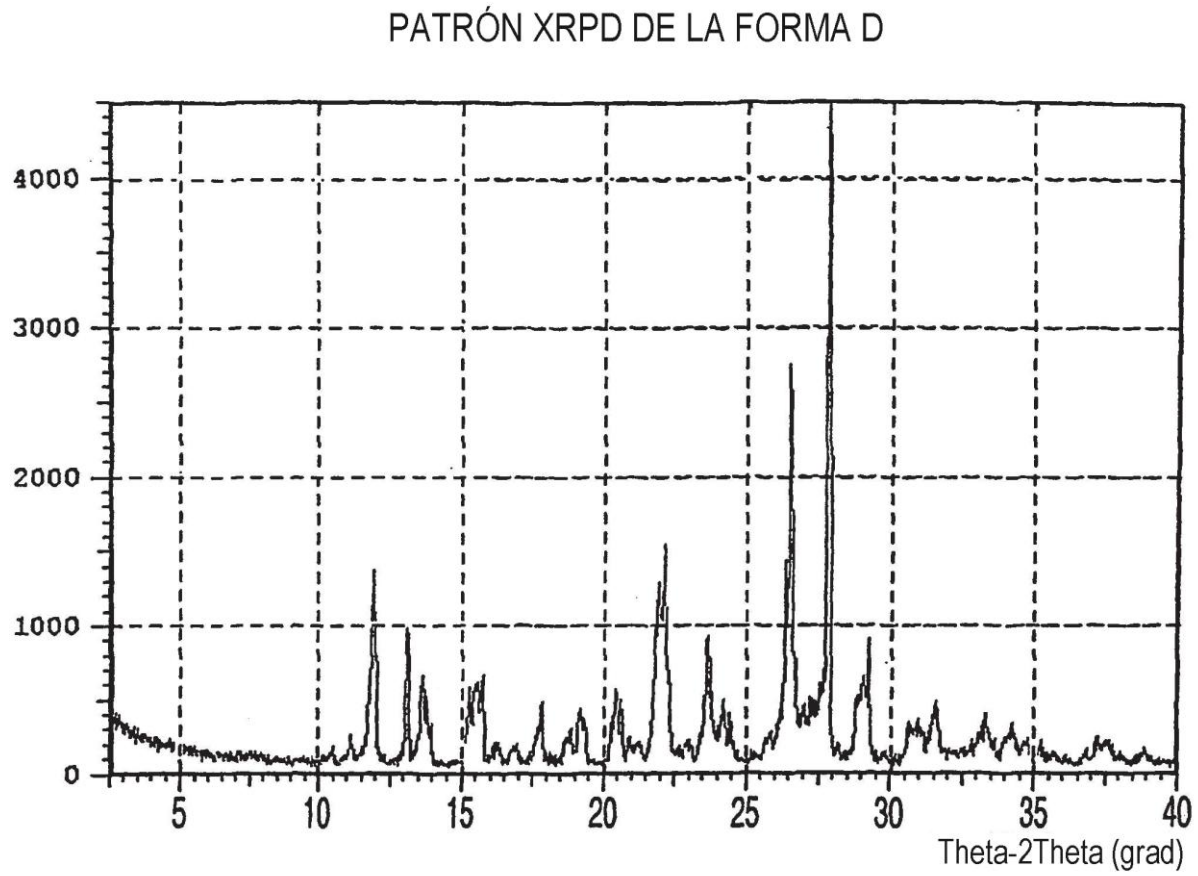

PATRÓN XRPD DE LA FORMA D
4000
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 18

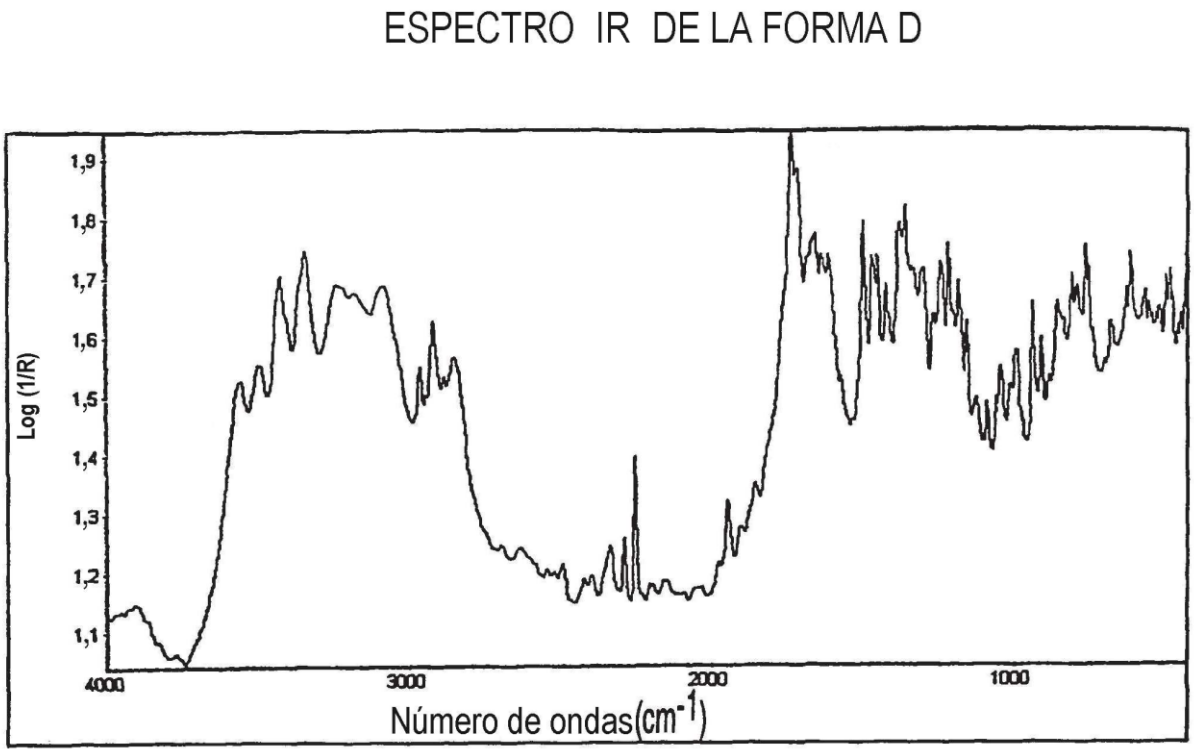

ESPECTRO IR DE LA FORMA D
Log (1/R)
1,9
1,8
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
4000
3000
2000
1000
Número de ondas(cm-1)

Fig. 19

ESPECTRO RAMAN DE LA FORMA D

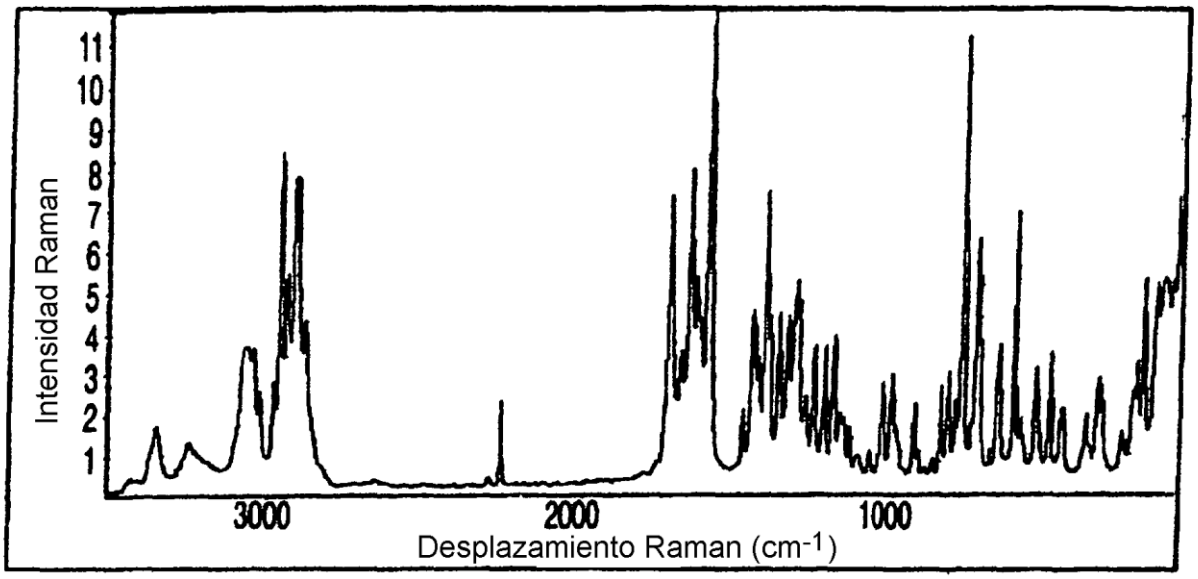


Fig. 20

TGA (ARRIBA) Y DSC (ABAJO) DE LA FORMA D

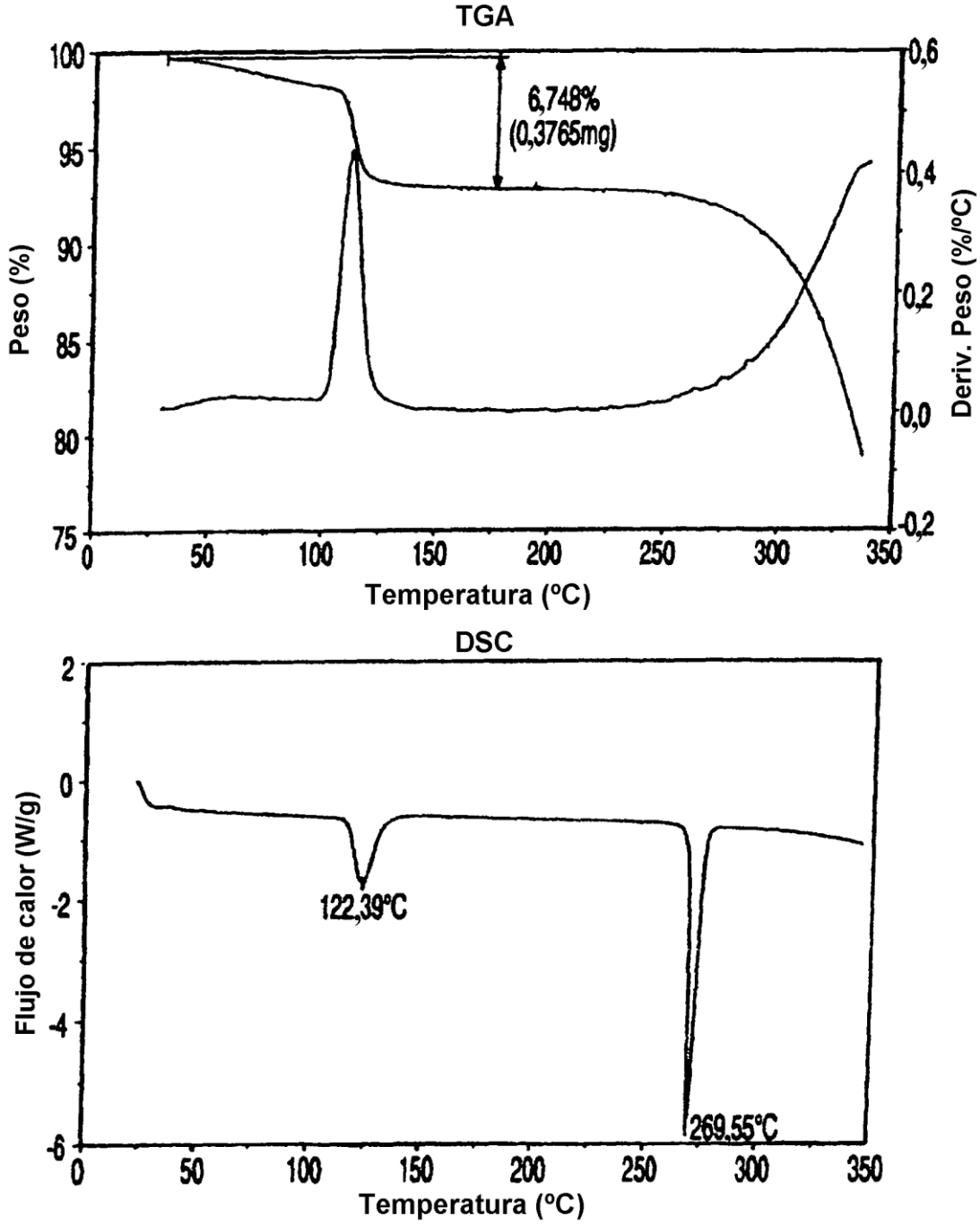


Fig. 21

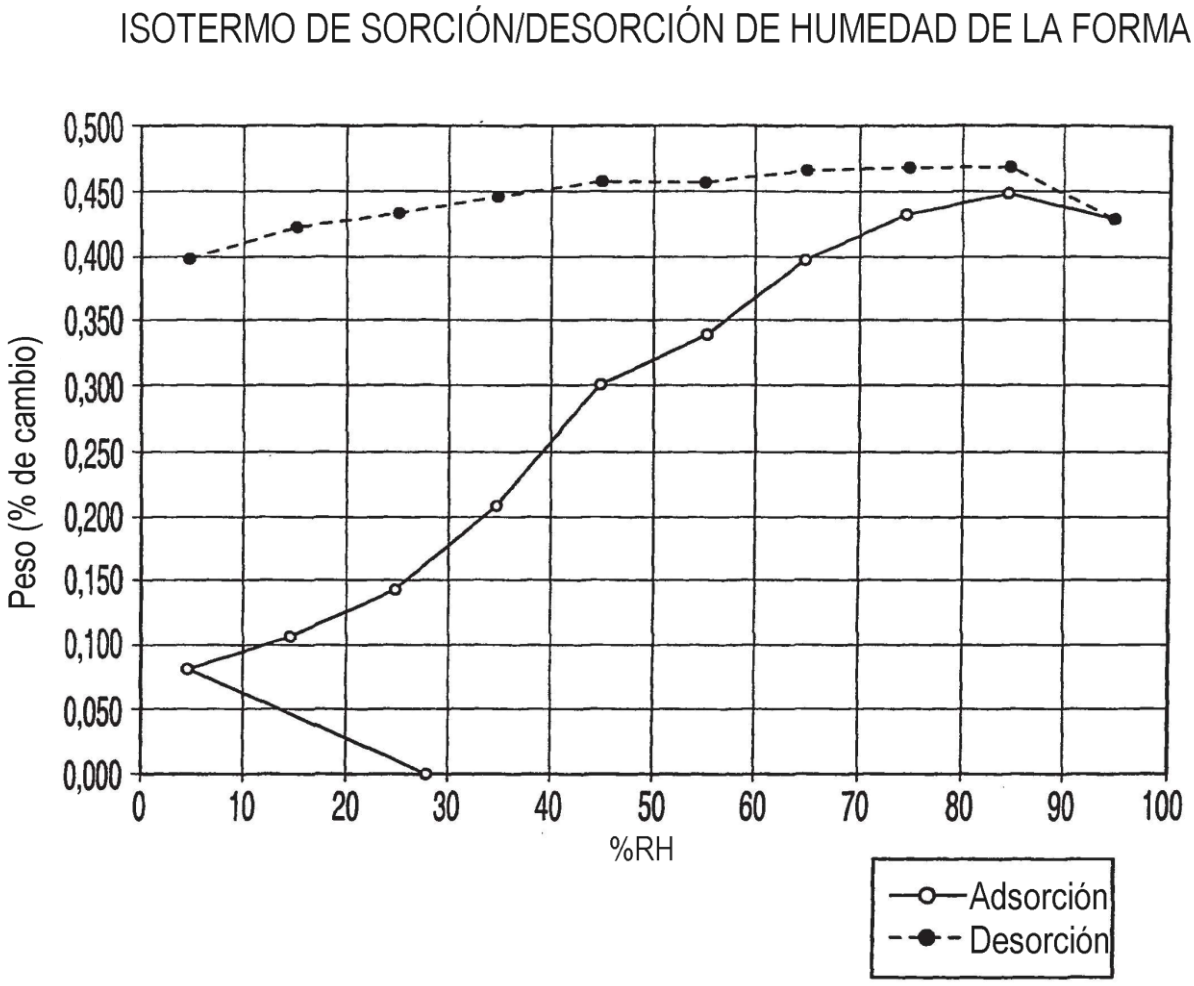

ISOTERMO DE SORCIÓN/DESORCIÓN DE HUMEDAD DE LA FORMA D
Peso (% de cambio)
0,500
0,450
0,400
0,350
0,300
0,250
0,200
0,150
0,100
0,050
0,000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
%RH
Adsorción
Desorción

Fig. 22

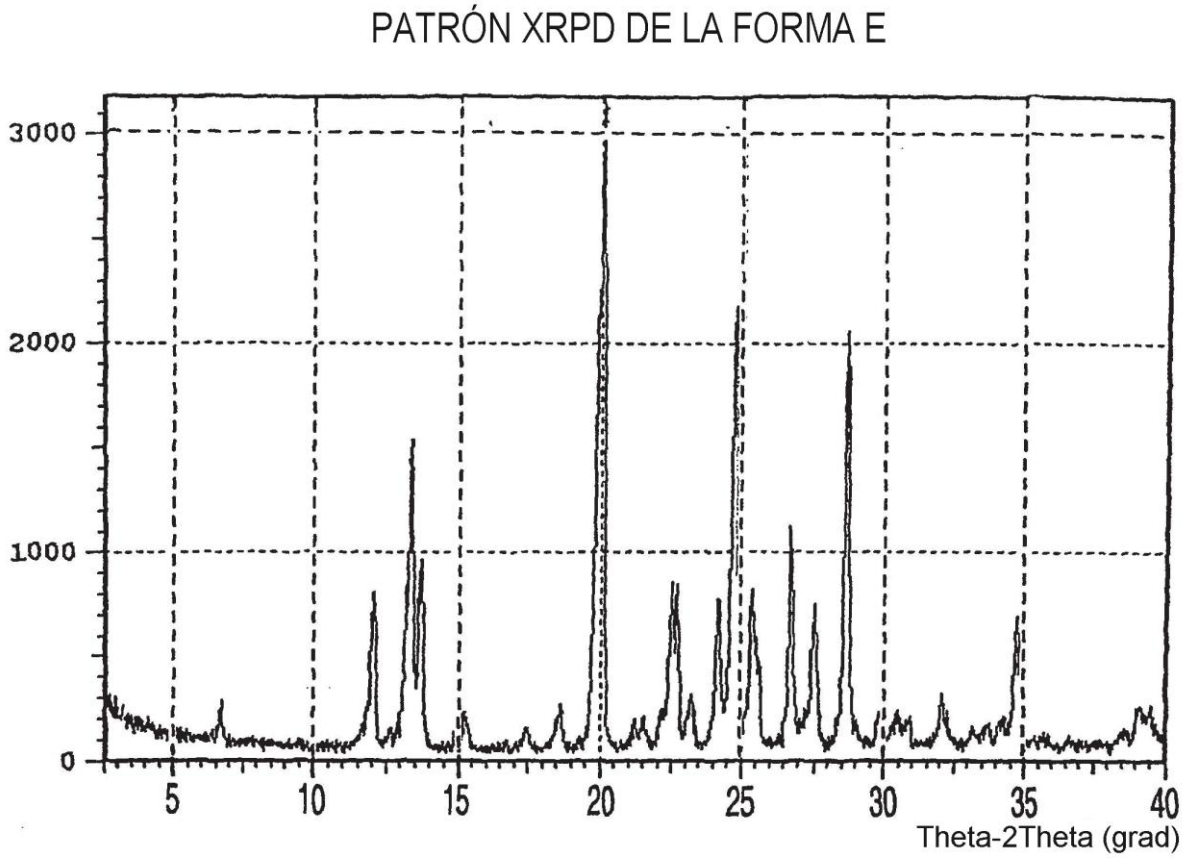

PATRÓN XRPD DE LA FORMA E
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 23

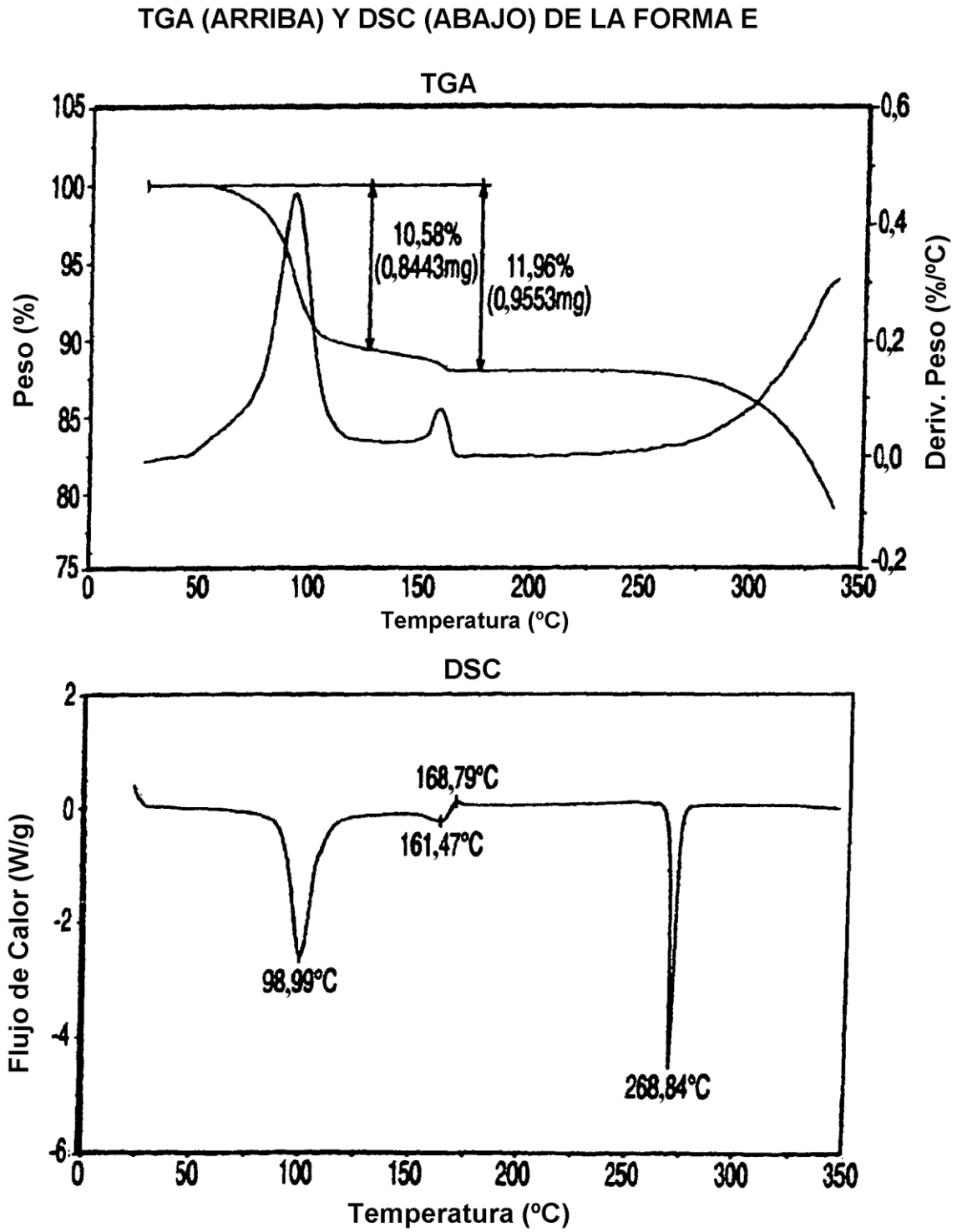

TGA (ARRIBA) Y DSC (ABAJO) DE LA FORMA E
TGA
Peso (%)
Deriv. Peso (%/°C)
Temperatura (°C)
10,58%
(0,8443mg)
11,96%
(0,9553mg)
DSC
Flujo de Calor (W/g)
Temperatura (°C)
168,79°C
161,47°C
98,99°C
268,84°C

Fig. 24

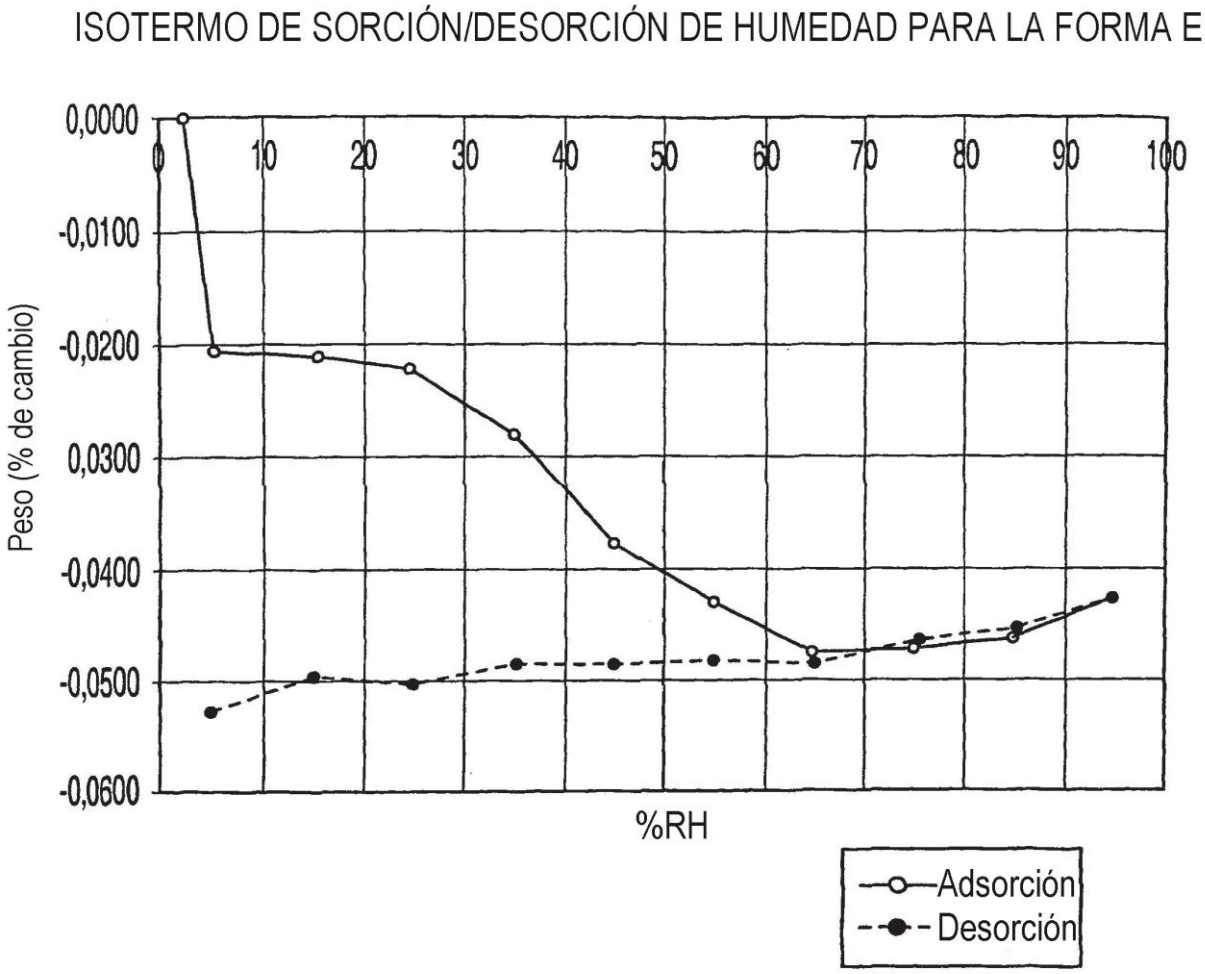

ISOTERMO DE SORCIÓN/DESORCIÓN DE HUMEDAD PARA LA FORMA E
0,0000
-0,0100
-0,0200
0,0300
-0,0400
-0,0500
-0,0600
Peso (% de cambio)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
%RH
Adsorción
Desorción

Fig. 25

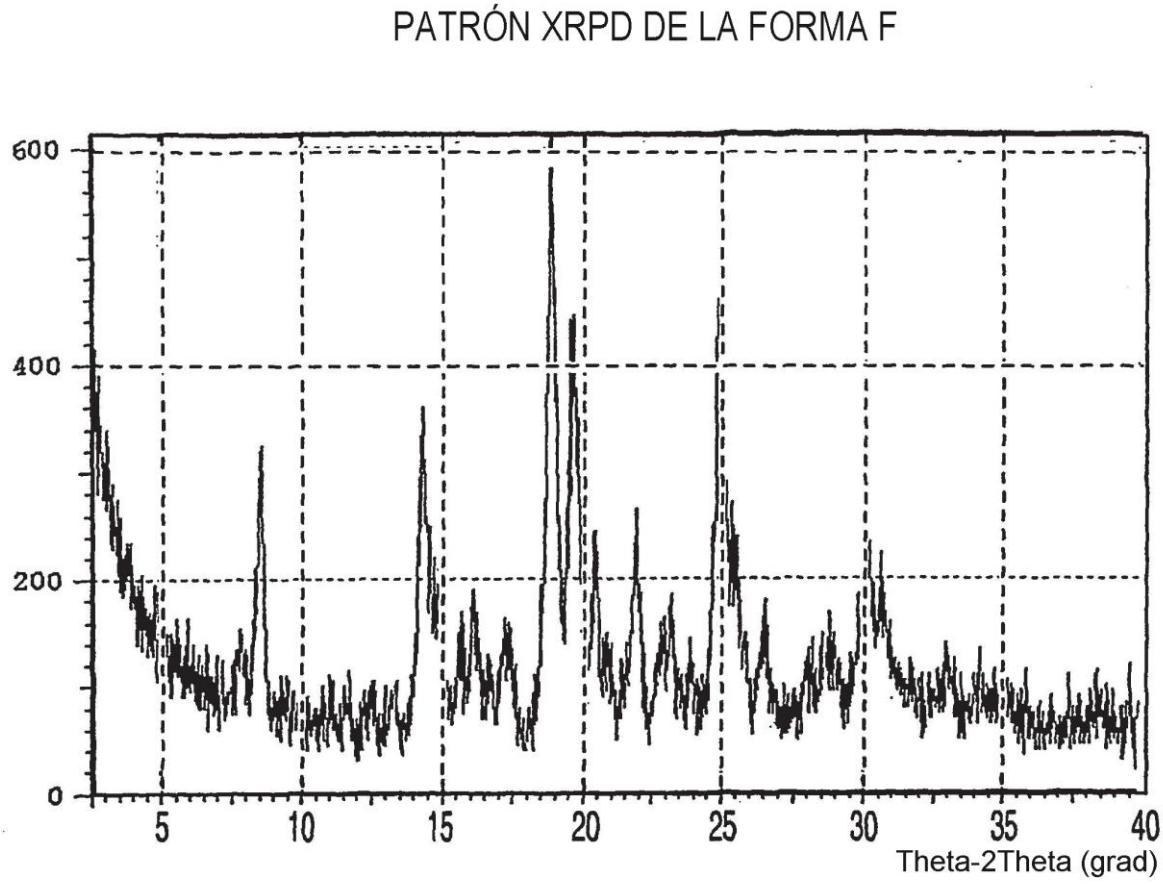

PATRÓN XRPD DE LA FORMA F
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 26

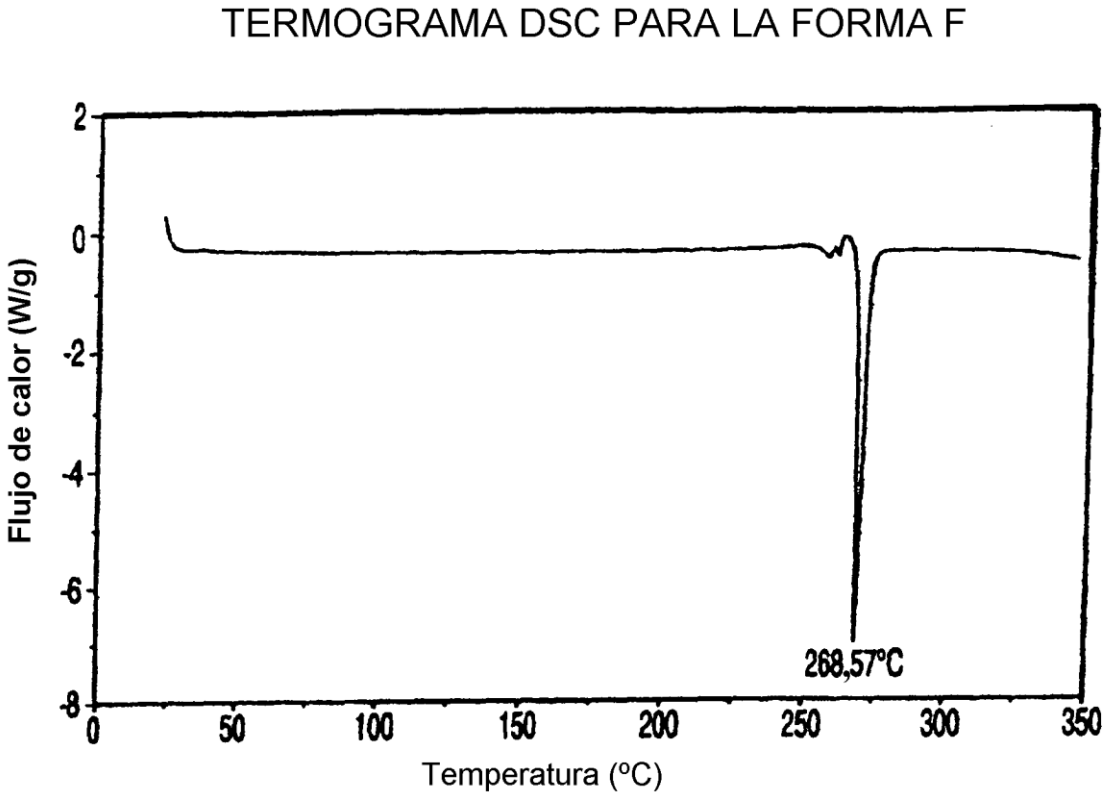

TERMOGRAMA DSC PARA LA FORMA F
Flujo de calor (W/g)
2
0
-2
-4
-6
-8
0
50
100
150
200
250
300
350
268,57°C
Temperatura (ºC)

Fig. 27

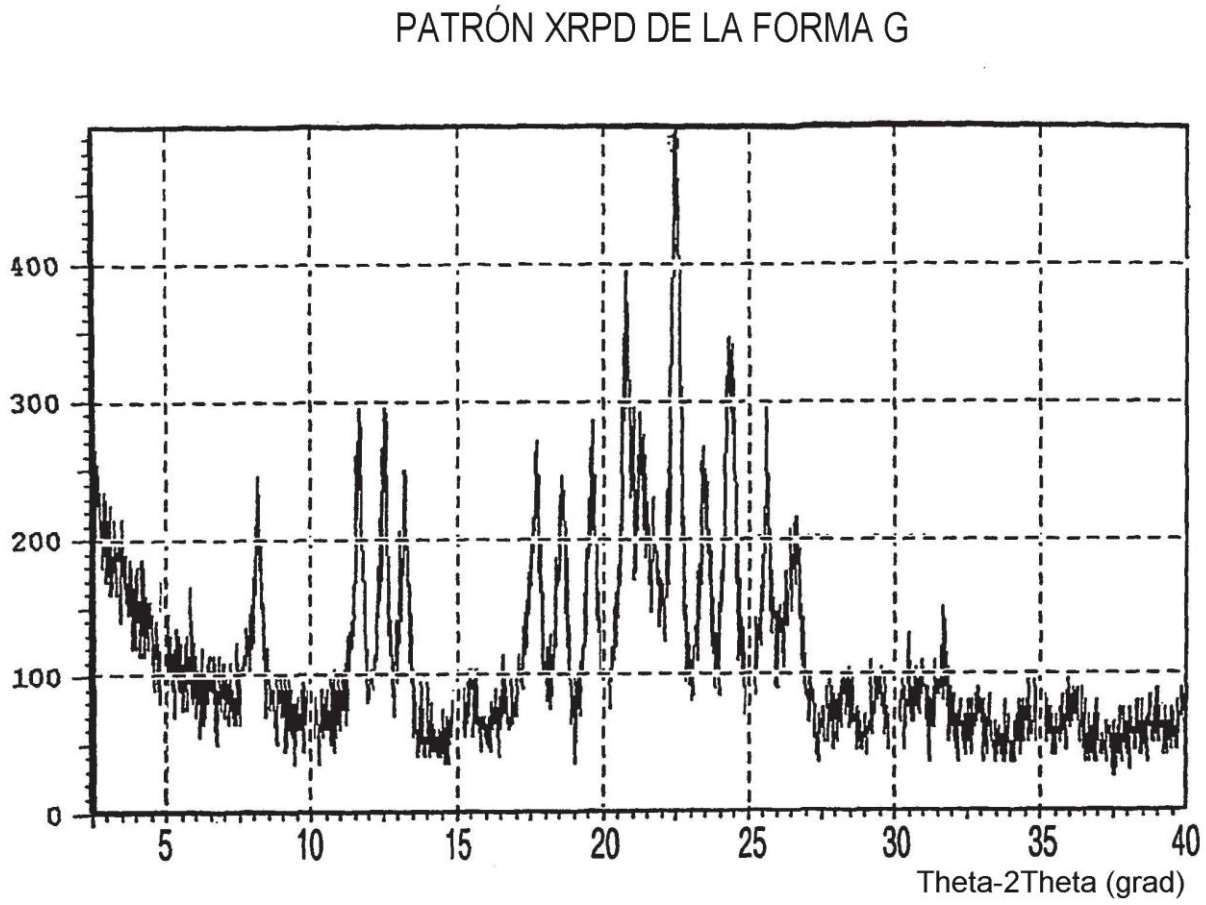

PATRÓN XRPD DE LA FORMA G
400
300
200
100
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 28

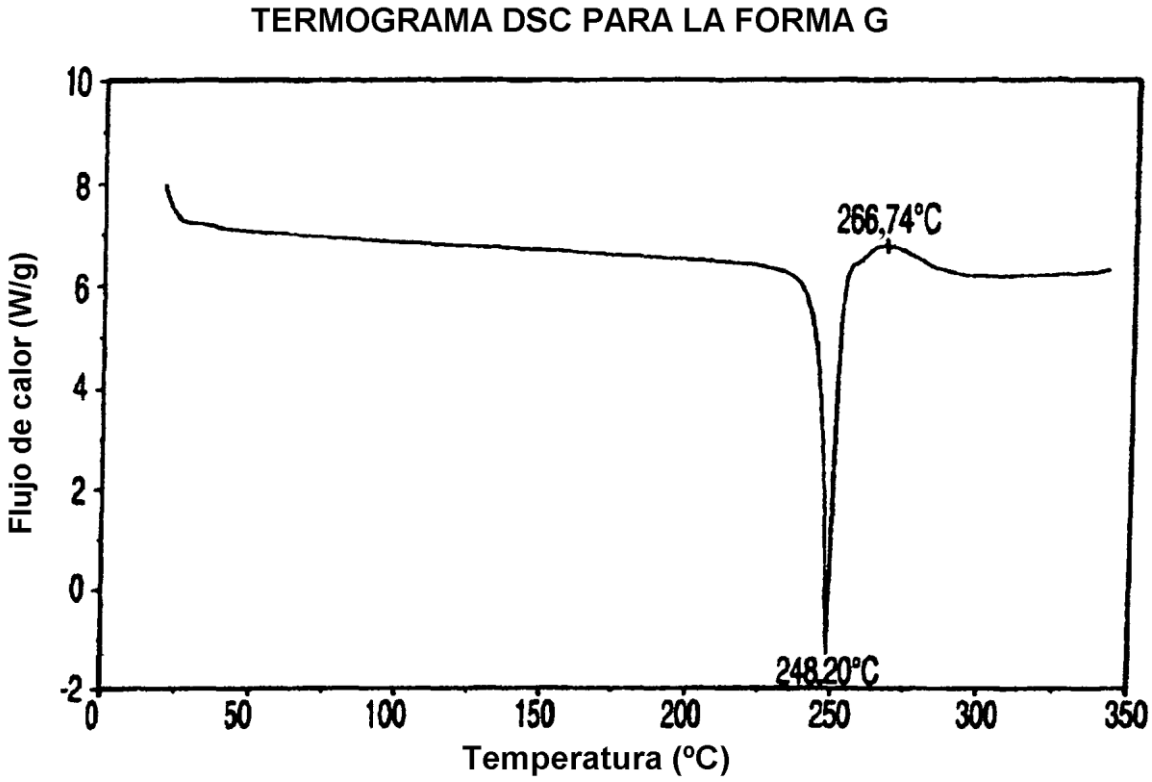

TERMOGRAMA DSC PARA LA FORMA G
Flujo de calor (W/g)
10
8
6
4
2
0
-2
0
50
100
150
200
250
300
350
Temperatura (ºC)
266,74°C
248,20°C

Fig. 29

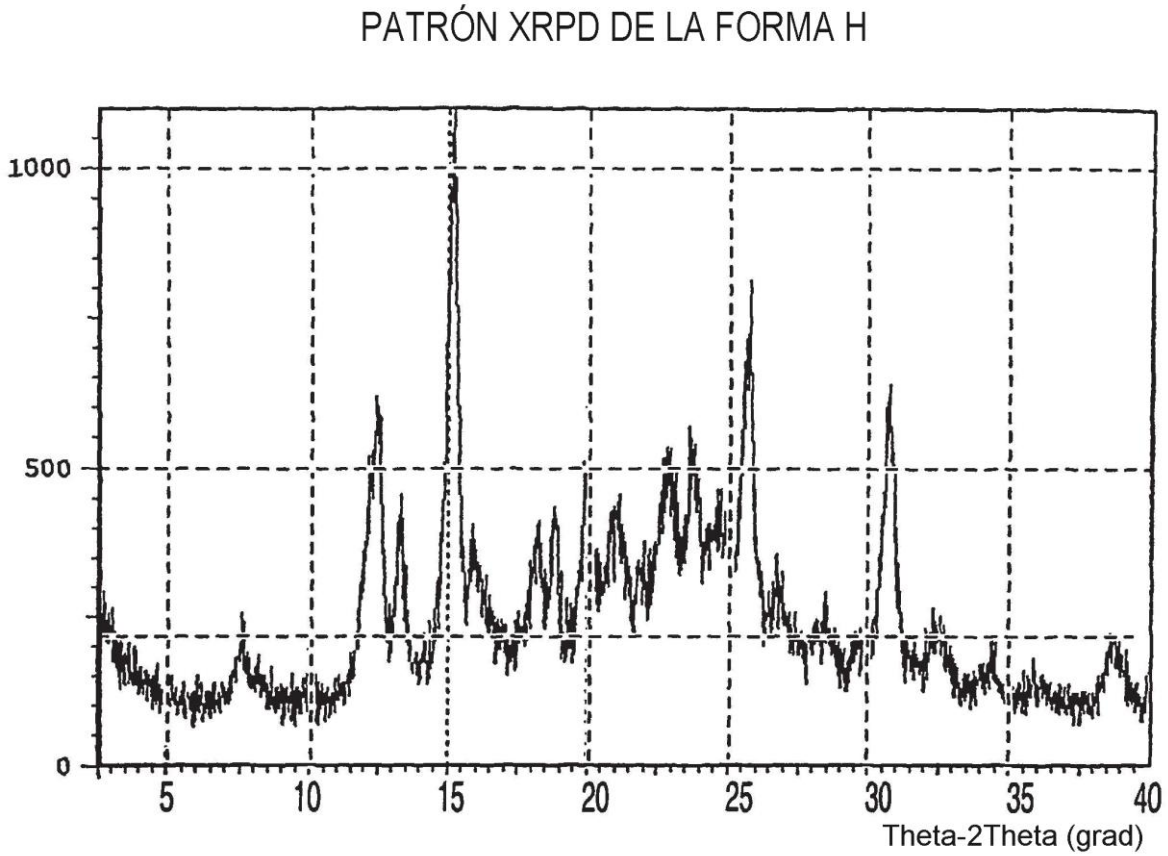

PATRÓN XRPD DE LA FORMA H
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Theta-2Theta (grad)

Fig. 30

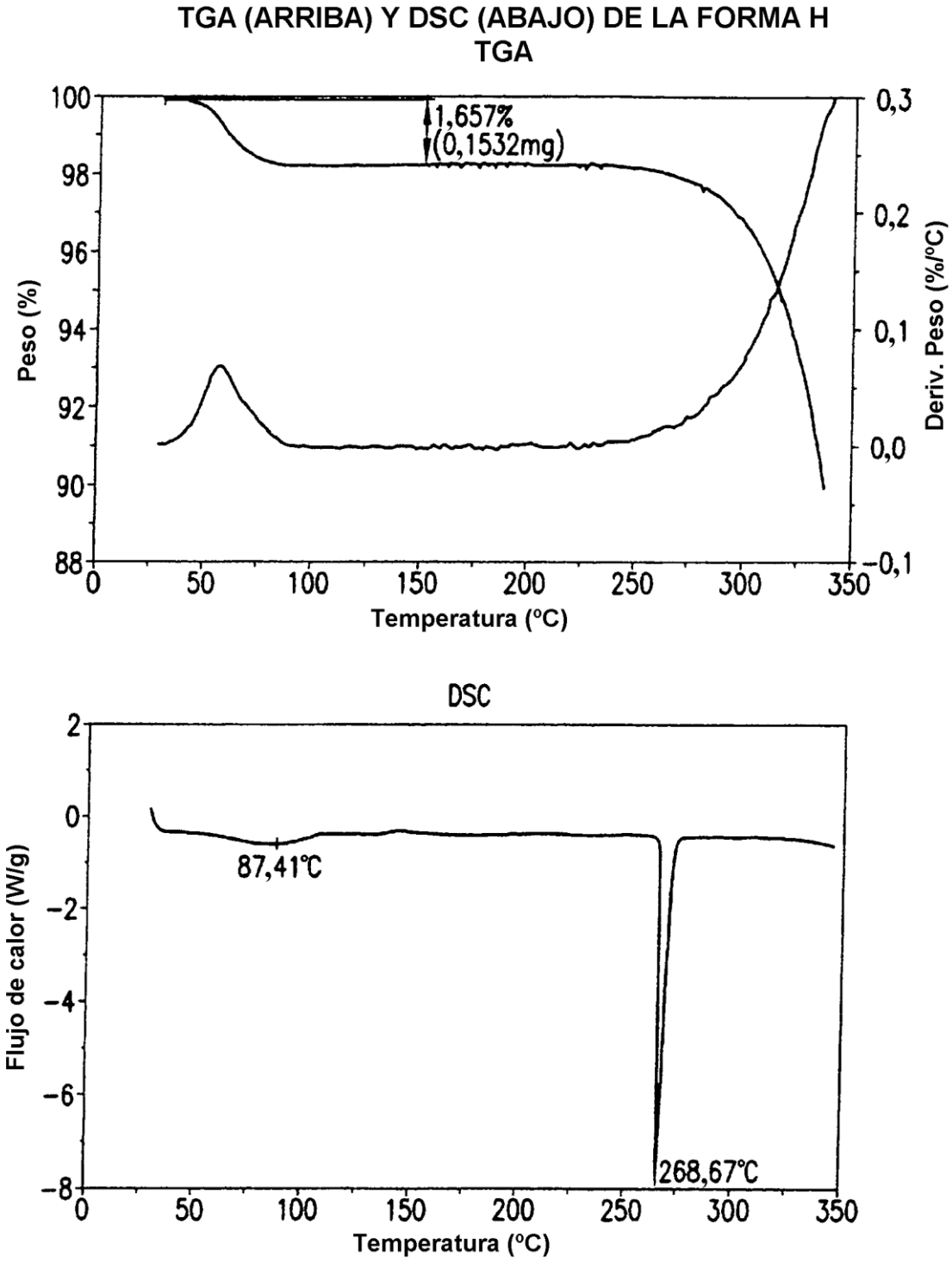

TGA (ARRIBA) Y DSC (ABAJO) DE LA FORMA H
TGA
1,657%
(0,1532mg)
Peso (%)
Deriv. Peso (%/°C)
Temperatura (°C)
DSC
87,41°C
268,67°C
Flujo de calor (W/g)
Temperatura (°C)

FIG.31

PATRÓN XRPD DEL POLIMORFO B

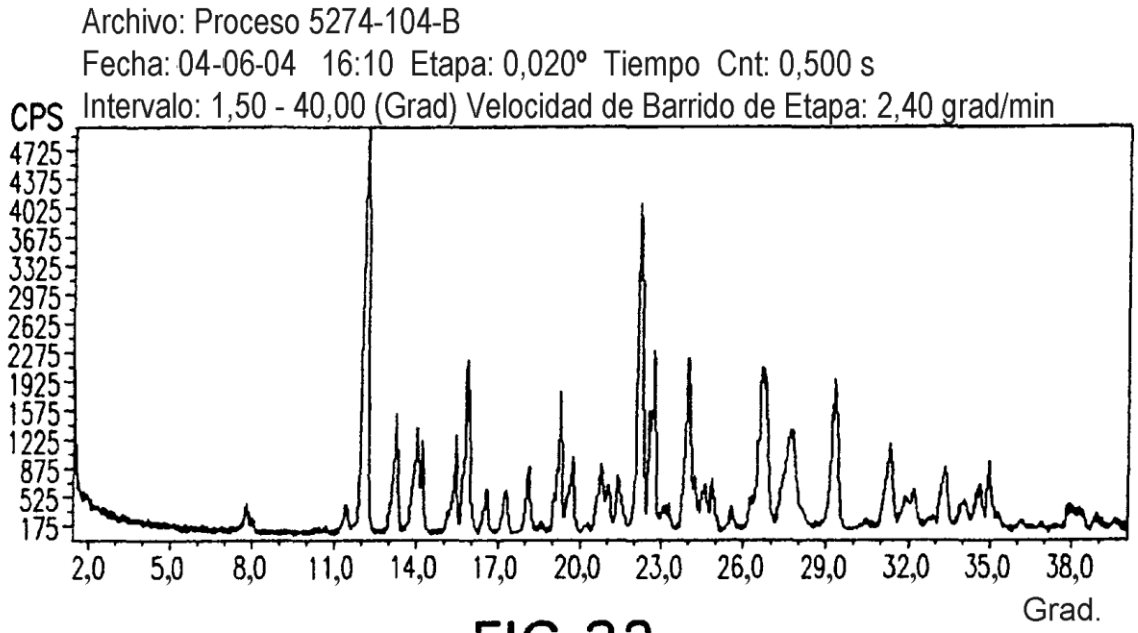


FIG.32

PATRÓN XRPD DEL POLIMORFO B

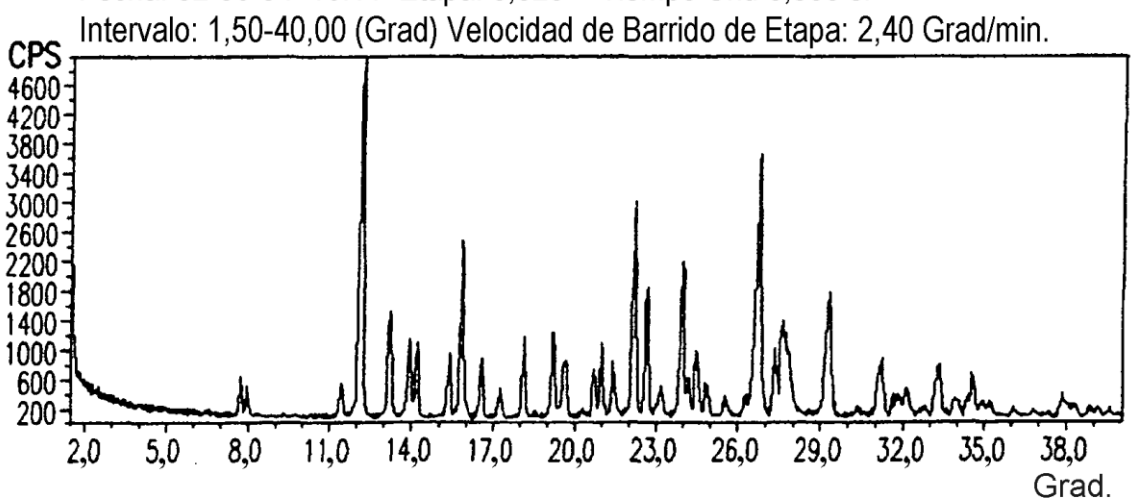


FIG.33

PATRÓN XRPD DEL POLIMORFO B

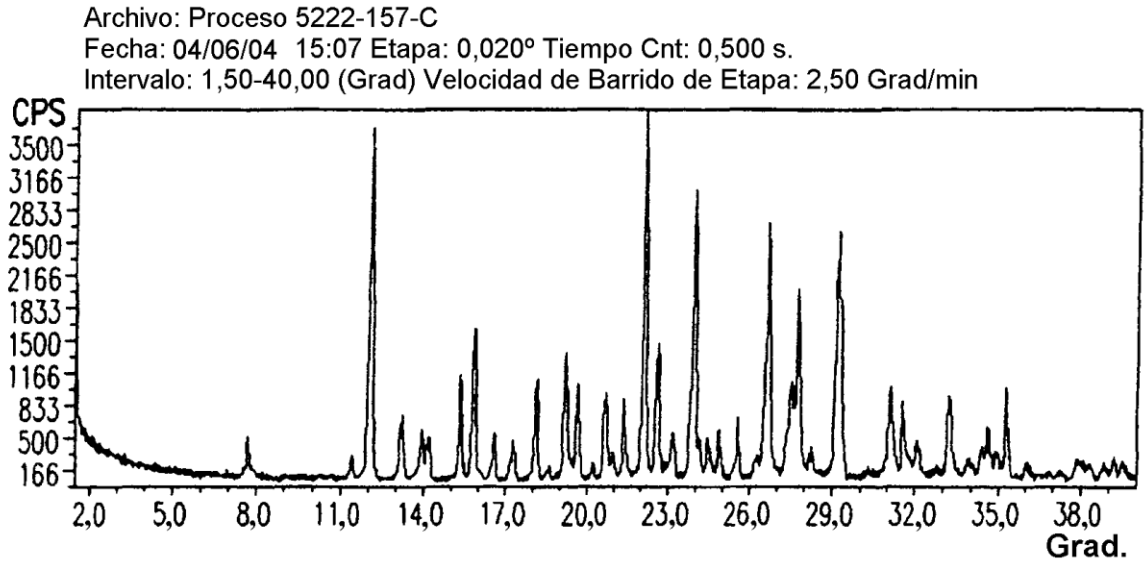


FIG.34

PATRÓN XRPD DEL POLIMORFO E

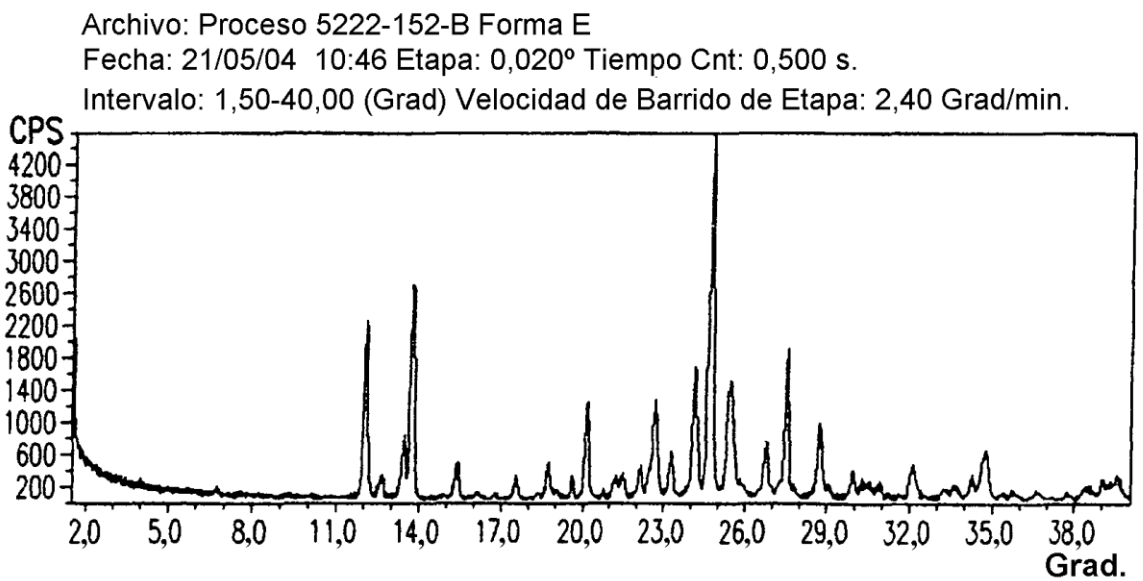


FIG.35

PATRÓN XRPD DE LA MEZCLA DE POLIMORFOS

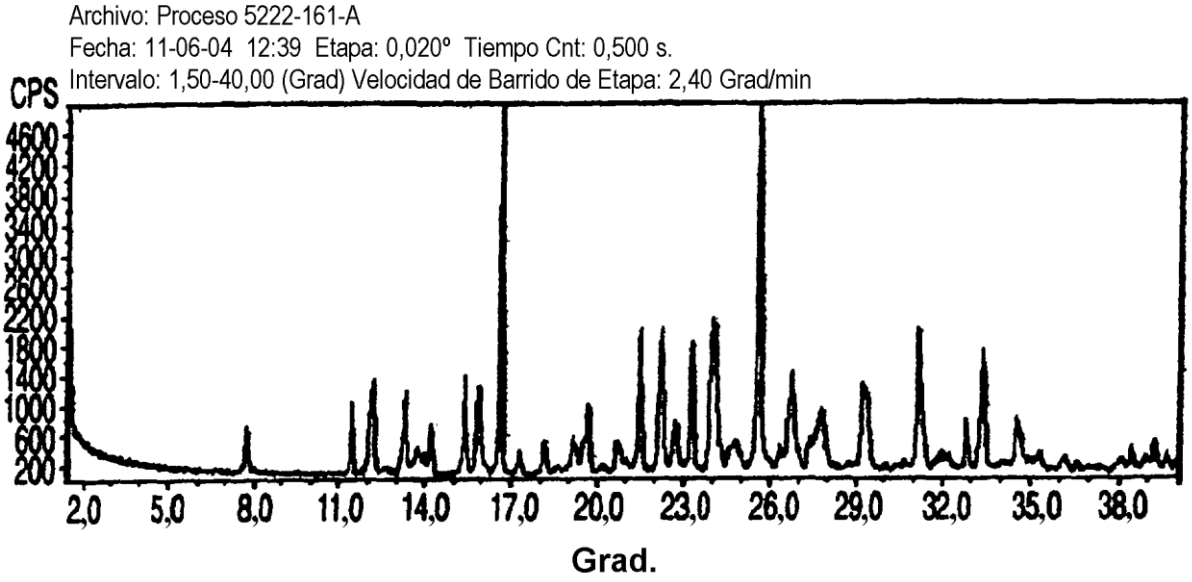


Fig. 36

CURVA TGA DEL POLIMORFO B

Muestra: 5274-104-B
Tamaño 7,8320mg
Método: Ramp

TGA

Fecha de ejecución: 09-Jun-04 17:04
Instrumento: TGA 0,500 V5.3 tipo 171

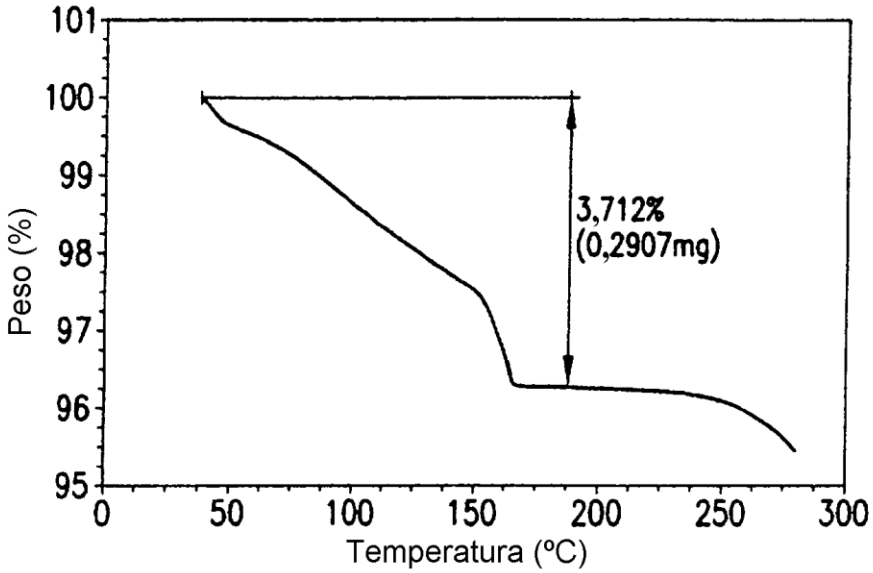


FIG.37

CURVA TGA DEL POLIMORFO B

Muestra: 5274-100-C
Tamaño 10,9430mg
Método: Ramp
Comentario: Evotec Lote 1675C H2O

TGA

Fecha de ejecución: 3-Jun-04 11:20
Instrumento: TGA 0,500 V5.3 tipo 171

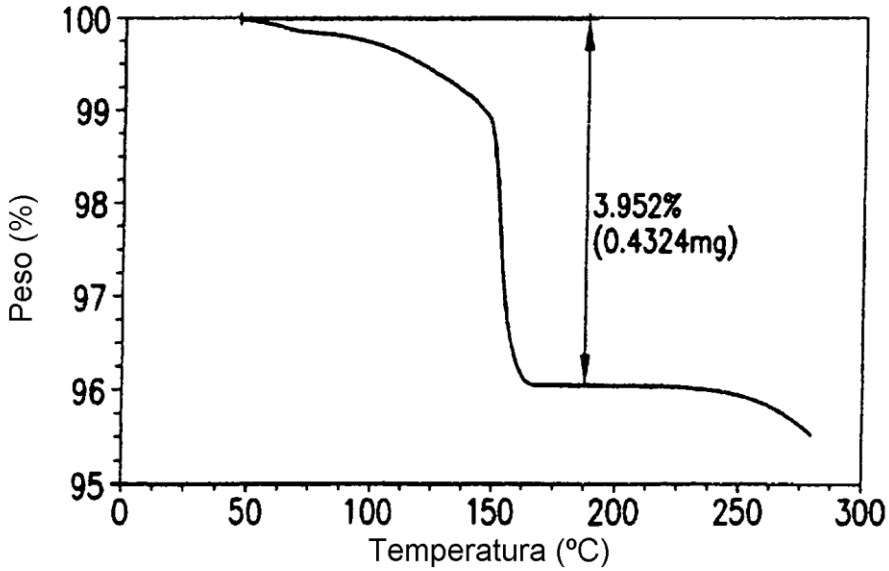


FIG.38

CURVA TGA DEL POLIMORFO B

TGA

Muestra: 5222-157-C
Tamaño: 24,4610mg
Método: Ramp
Comentario: Evotec Lote 17

Fecha de ejecución: 07-Jun-04 09:46
Instrumento: TGA 0,500 V5.3 tipo 171

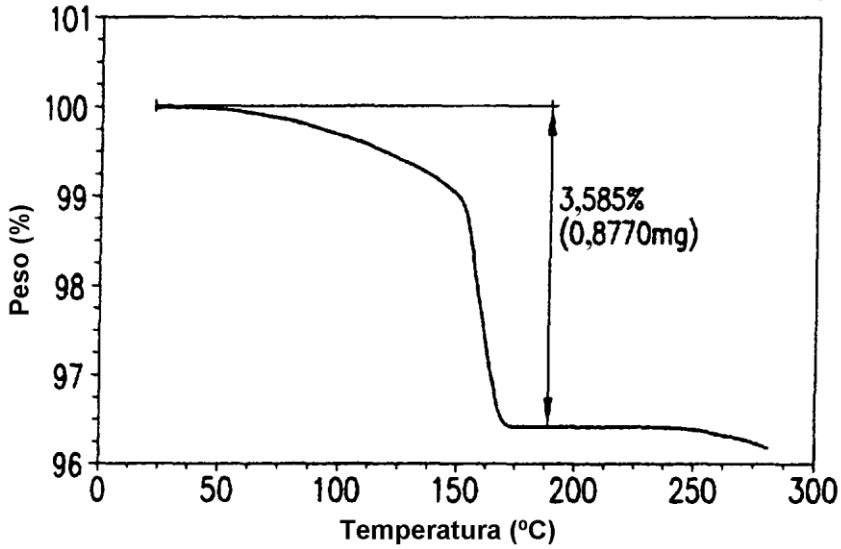


FIG.39

CURVA TGA DEL POLIMORFO E

TGA

Muestra: 5222-152-B
Tamaño: 11:3850mg
Método: Ramp
Comentario: Form E

Fecha de ejecución: 21-Mayo-04 09:34
Instrumento: TGA 0,500 V5.3 tipo 171

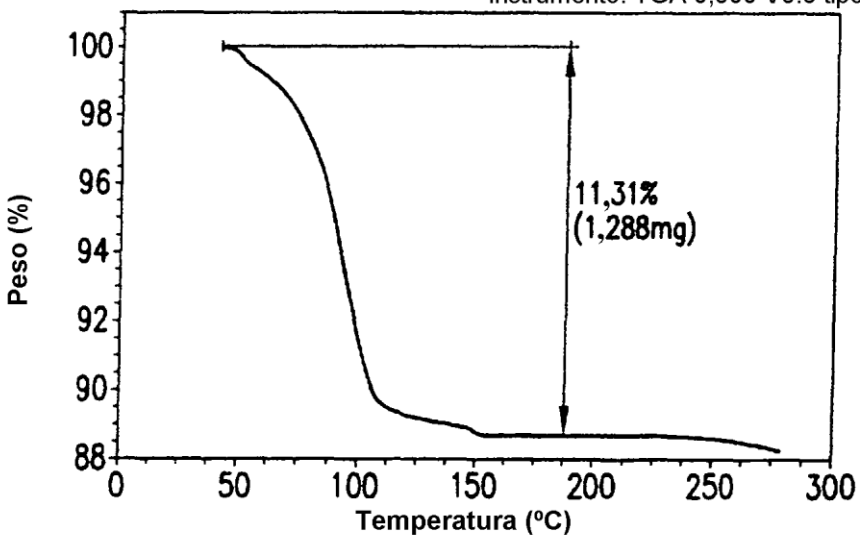


FIG.40

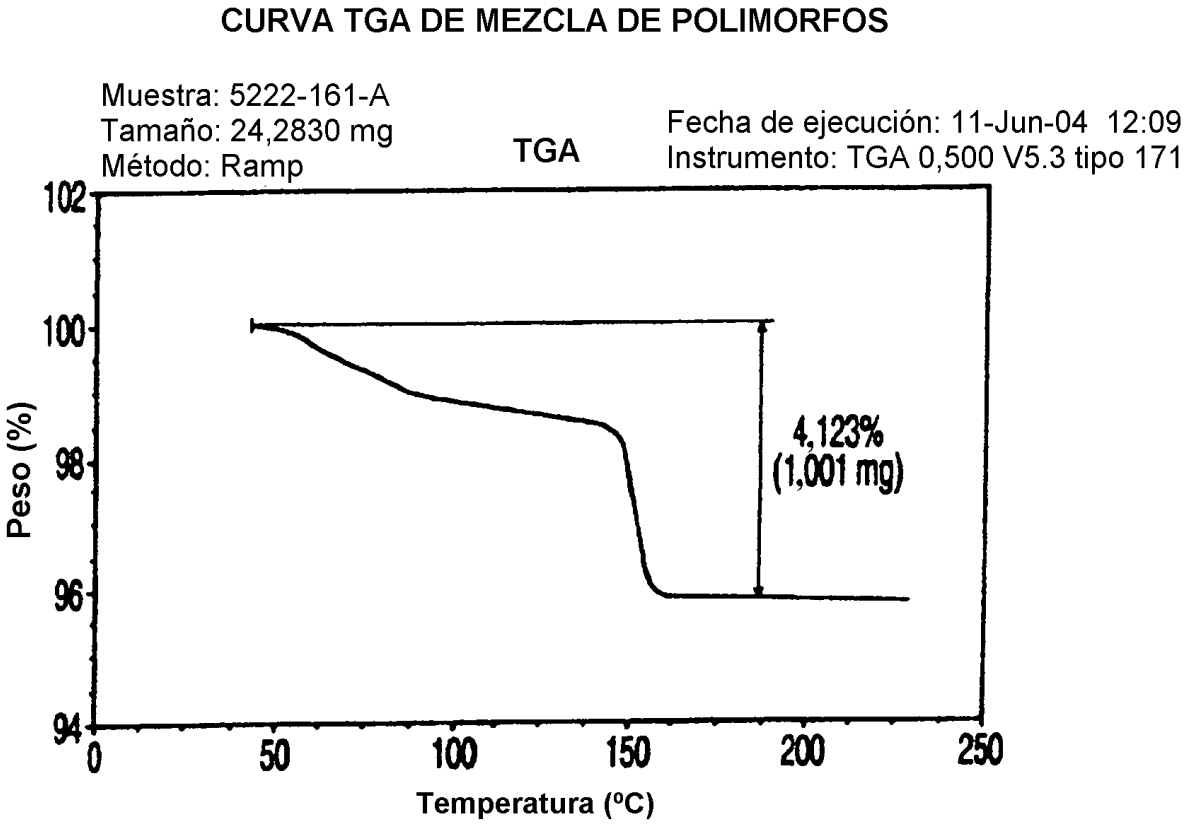

CURVA TGA DE MEZCLA DE POLIMORFOS
Muestra: 5222-161-A
Tamaño: 24,2830 mg
Método: Ramp
TGA
Fecha de ejecución: 11-Jun-04 12:09
Instrumento: TGA 0,500 V5.3 tipo 171
102
100
98
96
94
Peso (%)
4,123%
(1,001 mg)
0
50
100
150
200
250
Temperatura (°C)

Fig. 41

DSC DEL POLIMORFO B

DSC

Muestra: 5274-104-B
Tamaño: 0,0000mg
Método: Calibración constante celular
Comentario: OAI lote 15 22b

Fecha de ejecución: 07-Jun-04 11:30
Instrumento: DSC Q 1000 V7.3 tipo 249

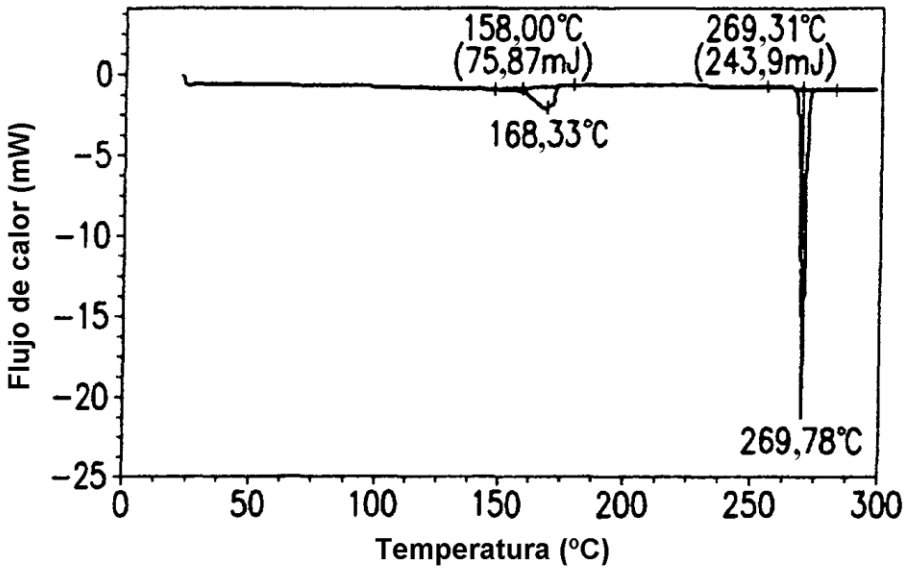


FIG.42

DSC DEL POLIMORFO B

DSC

Muestra: 5274-100-C
Tamaño: 0,0000mg
Método: Calibración constante celular
Comentario: Evotec Lote 1675C 10vol 24h 3h seco

Fecha de ejecución: 02-Jun-04 17:01
Instrumento: DSC Q 1000 V7.3 tipo 249

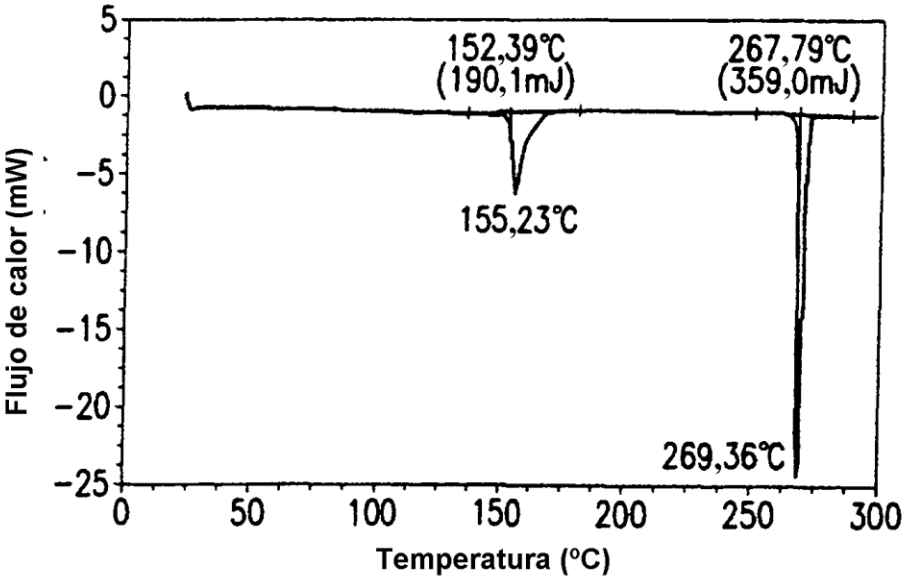


FIG.43

DSC DEL POLIMORFO B

Muestra: 5222-157-C
Tamaño: 0,0000mg
Método: Calibración constante celular
Comentario: OAI lote 17

DSC

Fecha de ejecución: 07-Jun-04 09:45
Instrumento: DSC Q 1000 V7.3 tipo 249

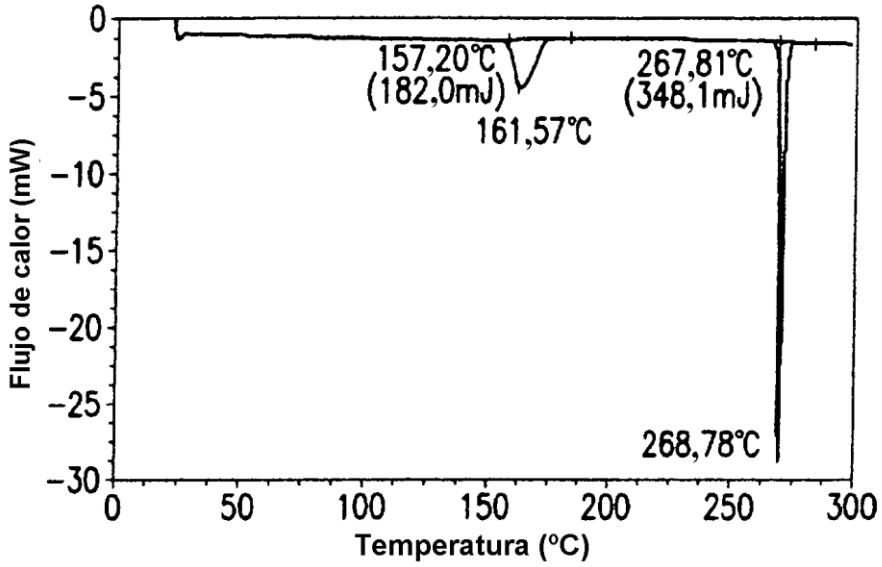


FIG.44

DSC DEL POLIMORFO E

Muestra: 5222-152-B
Tamaño: 3,45000mg
Método: Calibración constante celular
Comentario: Evotec lote 15 Form E

DSC

Fecha de ejecución: 21-Mayo-04
Instrumento: DSC Q 1000 V7.3 tipo 249

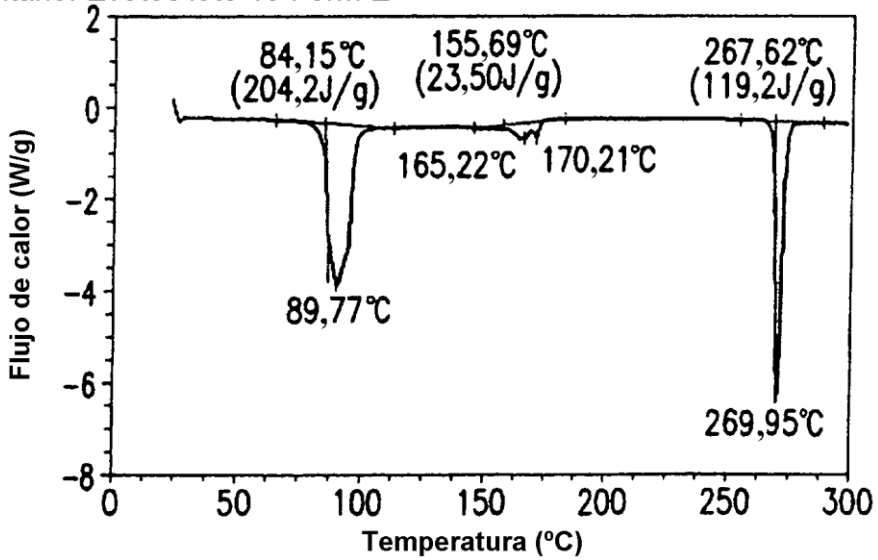


FIG.45

DSC DE MEZCLA DE POLIMORFOS
DSC

Muestra: 5222-161-A
Tamaño: 0,0000mg
Método: Calibración constante celular
Comentario: OAI lote 15

Fecha de ejecución: 11-Jun-04 12:44
Instrumento: DSC Q 1000 V7.3 tipo 249

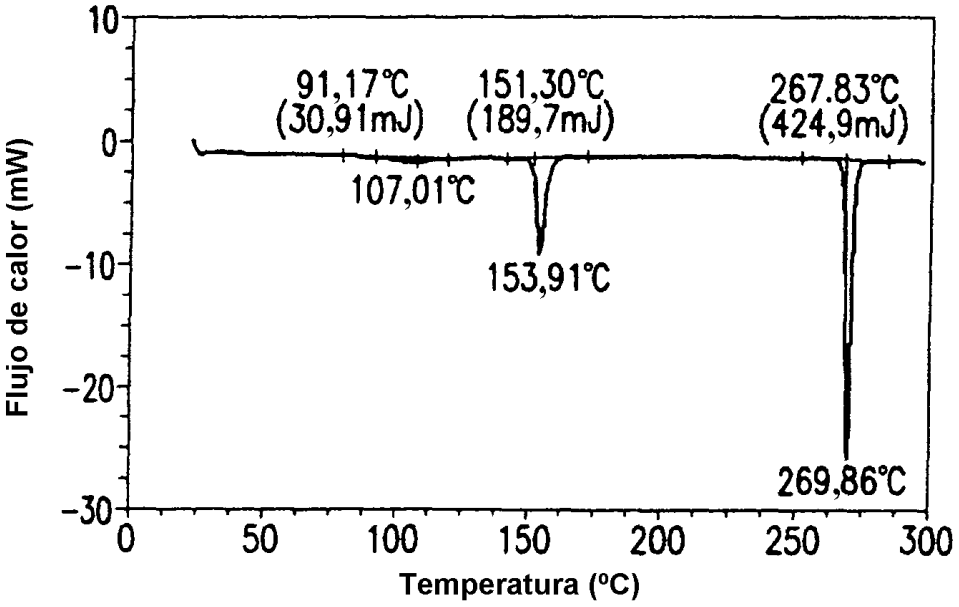


FIG.46

BARRIDO UV-Vis DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN

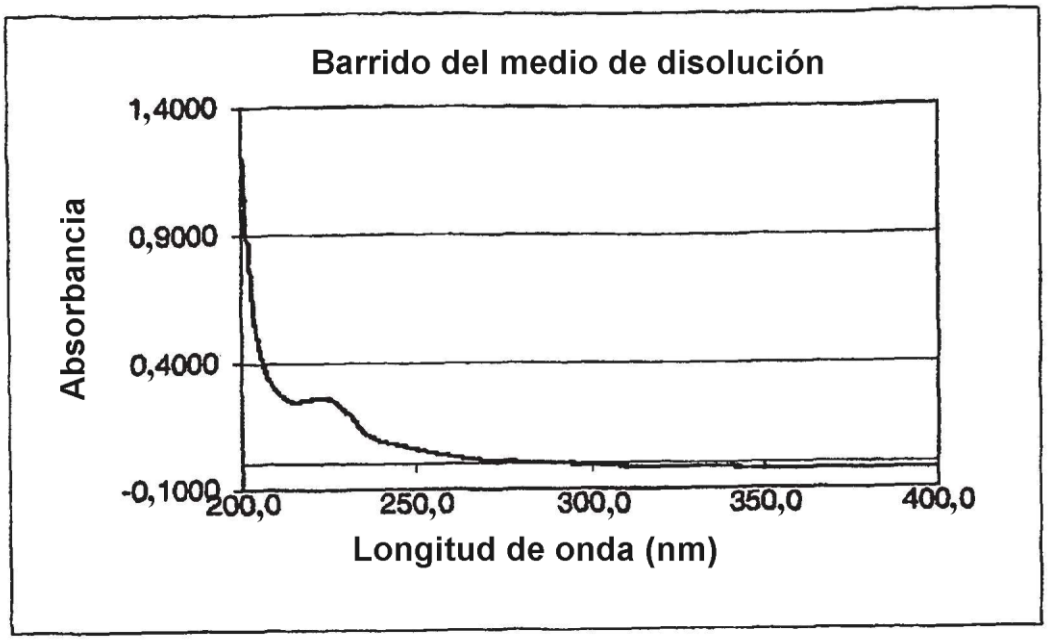


Fig. 47

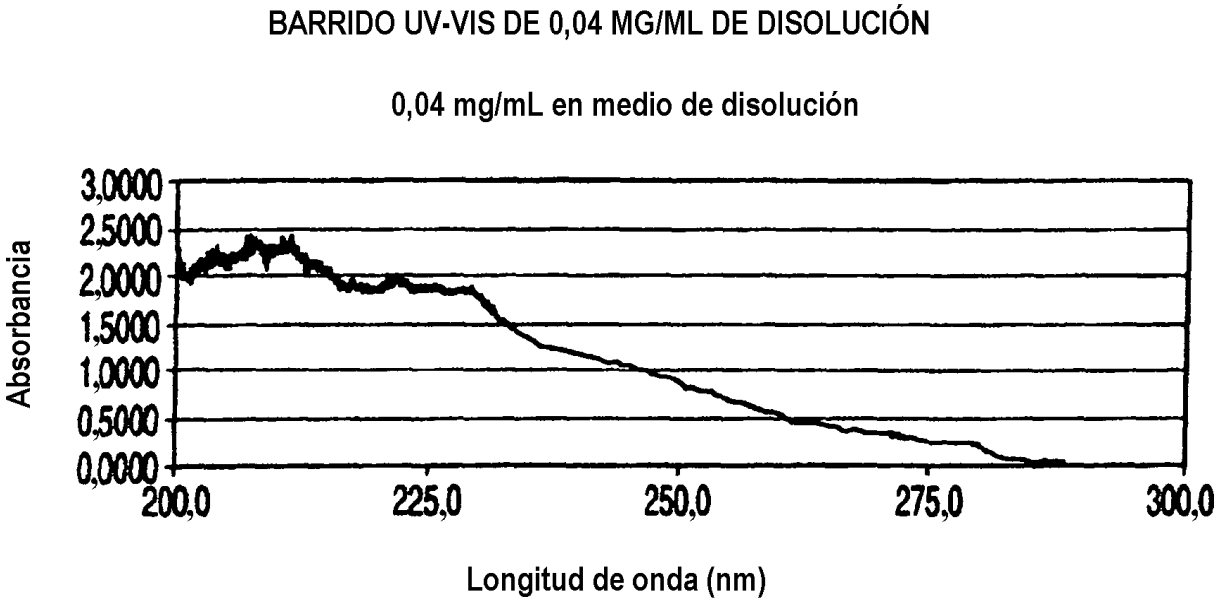

BARRIDO UV-VIS DE 0,04 MG/ML DE DISOLUCIÓN
0,04 mg/mL en medio de disolución
Absorbancia
3,0000
2,5000
2,0000
1,5000
1,0000
0,5000
0,0000
200,0
225,0
250,0
275,0
300,0
Longitud de onda (nm)

Fig. 48

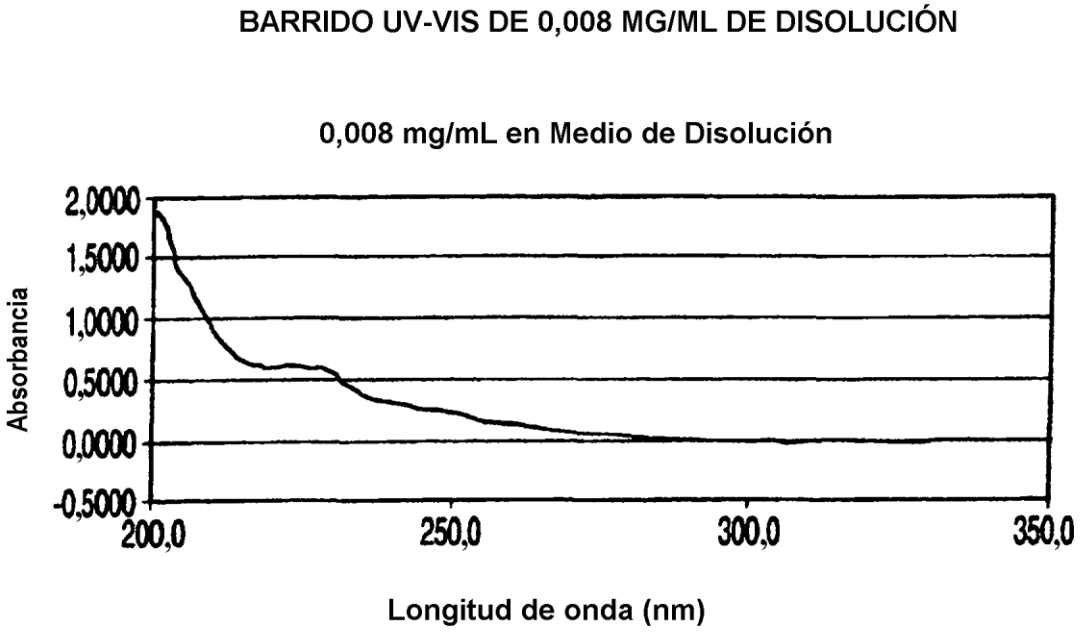

BARRIDO UV-VIS DE 0,008 MG/ML DE DISOLUCIÓN
0,008 mg/mL en Medio de Disolución
Absorbancia
2,0000
1,5000
1,0000
0,5000
0,0000
-0,5000
200,0
250,0
300,0
350,0
Longitud de onda (nm)

Fig. 49

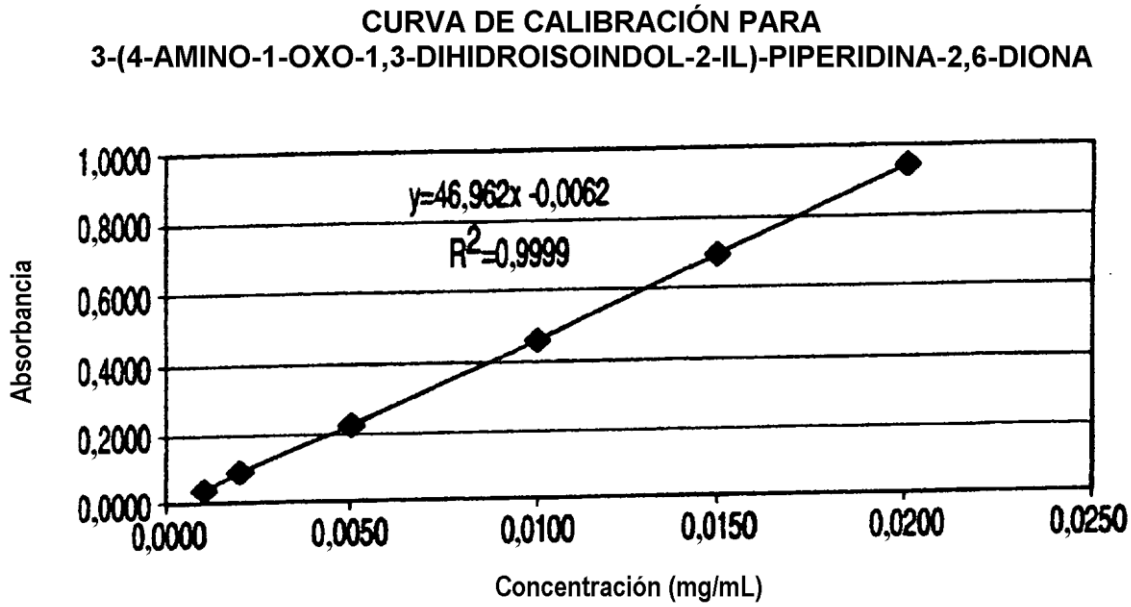

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA
3-(4-AMINO-1-OXO-1,3-DIHIDROISOINDOL-2-IL)-PIPERIDINA-2,6-DIONA
y=46,962x -0,0062
R2=0,9999
Absorbancia
1,0000
0,8000
0,6000
0,4000
0,2000
0,0000
0,0000
0,0050
0,0100
0,0150
0,0200
0,0250
Concentración (mg/mL)

Fig. 50

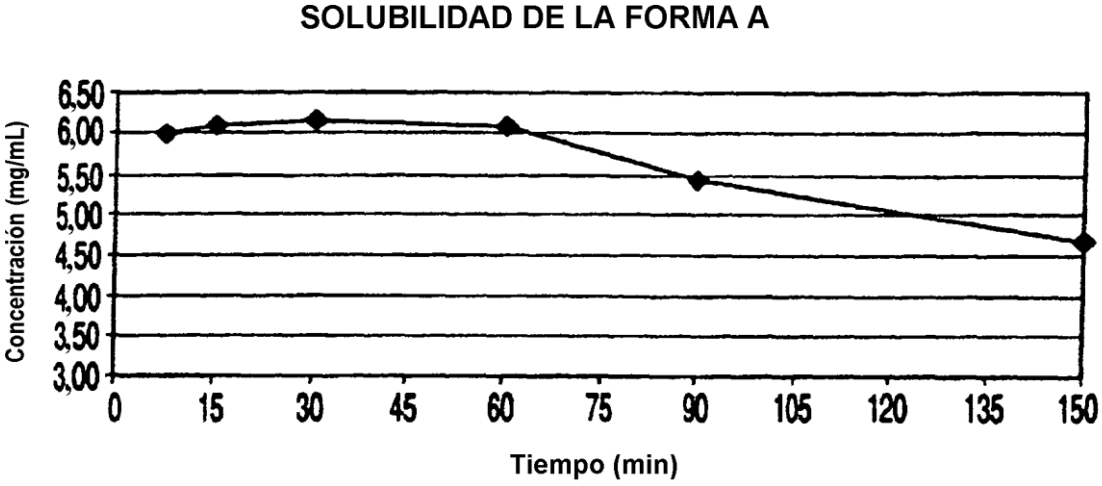

SOLUBILIDAD DE LA FORMA A
Concentración (mg/mL)
6,50
6,00
5,50
5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
Tiempo (min)

Fig. 51

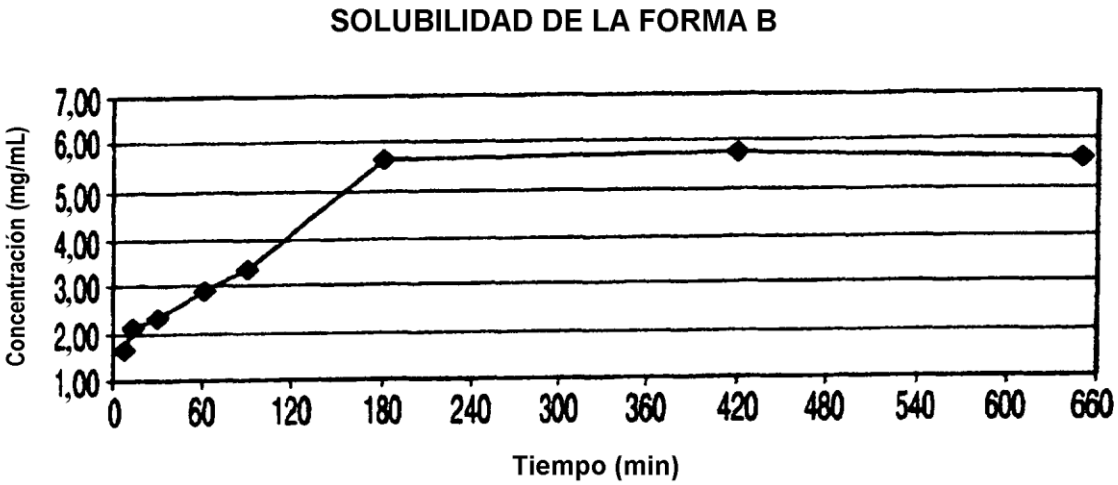

SOLUBILIDAD DE LA FORMA B
Concentración (mg/mL)
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0
60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
Tiempo (min)

Fig. 52

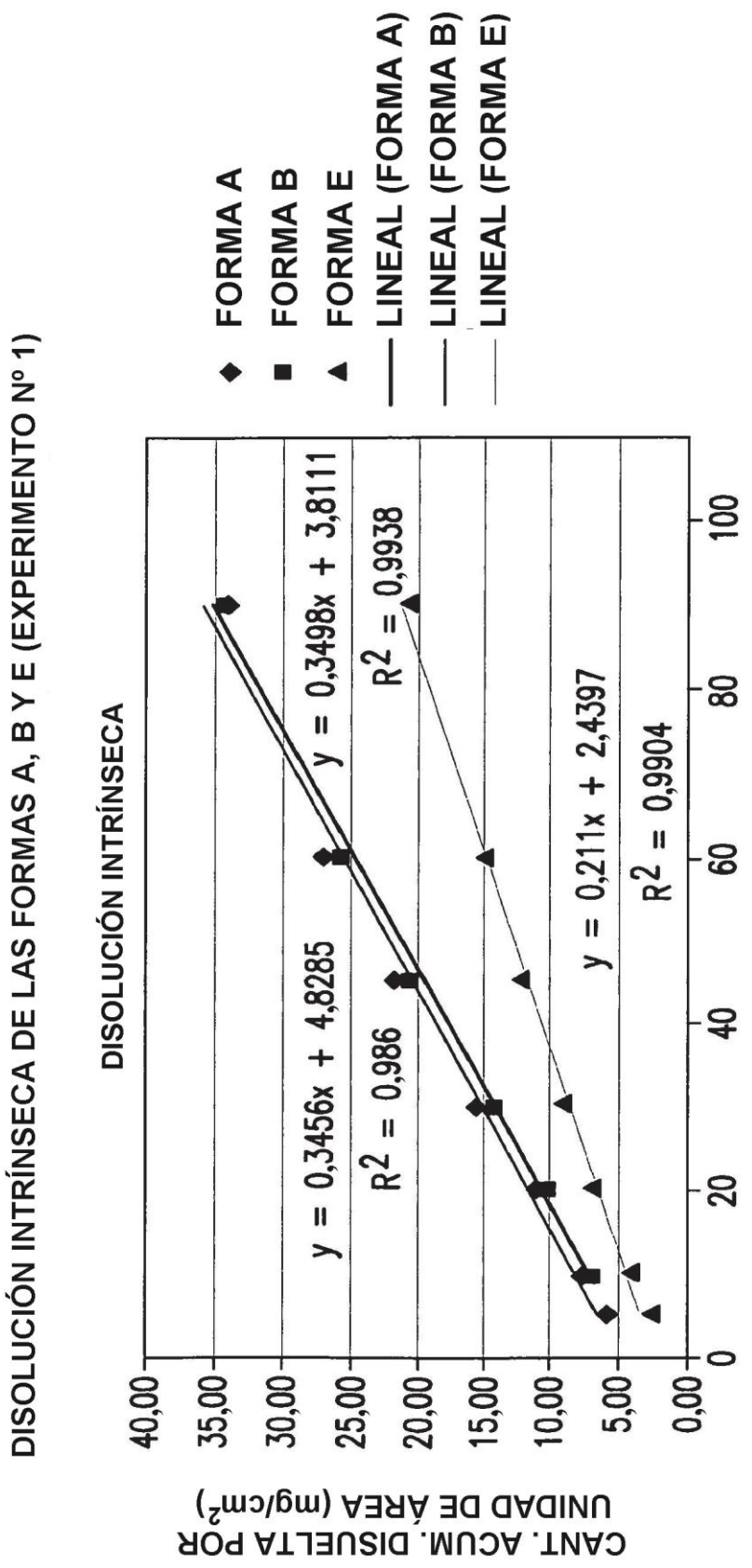

DISOLUCIÓN INTRÍNSECA DE LAS FORMAS A, B Y E (EXPERIMENTO Nº 1)
DISOLUCIÓN INTRÍNSECA
FORMA A
FORMA B
FORMA E
LINEAL (FORMA A)
LINEAL (FORMA B)
LINEAL (FORMA E)
y = 0,3456x + 4,8285
R2 = 0,986
y = 0,3498x + 3,8111
R2 = 0,9938
y = 0,211x + 2,4397
R2 = 0,9904
CANT. ACUM. DISUELTA POR UNIDAD DE ÁREA (mg/cm2)
TIEMPO (MIN)
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
0
20
40
60
80
100

FIG.53

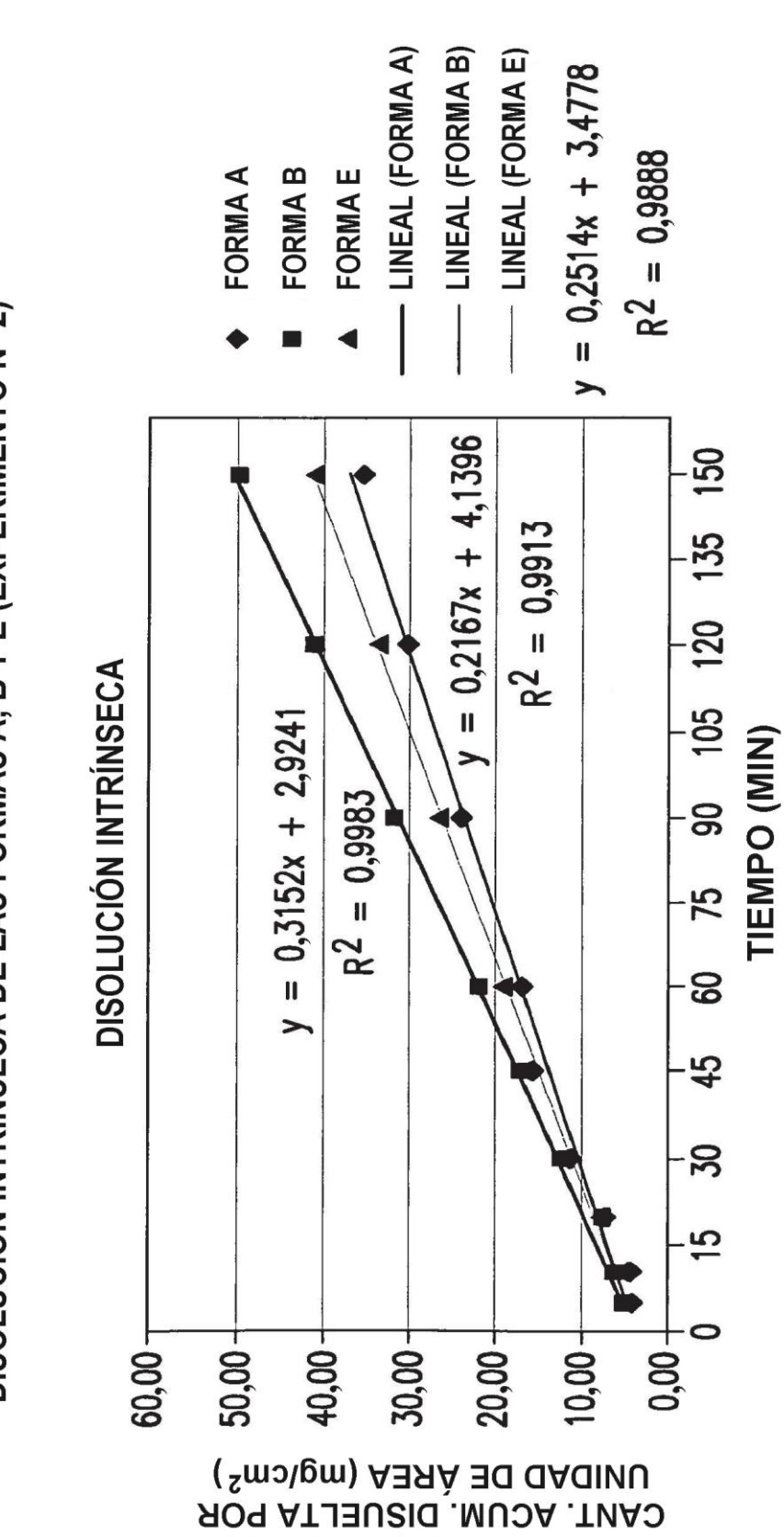

DISOLUCIÓN INTRÍNSECA DE LAS FORMAS A, B Y E (EXPERIMENTO Nº 2)
DISOLUCIÓN INTRÍNSECA
FORMA A
FORMA B
FORMA E
LINEAL (FORMA A)
LINEAL (FORMA B)
LINEAL (FORMA E)
y = 0,3152x + 2,9241
R2 = 0,9983
y = 0,2167x + 4,1396
R2 = 0,9913
y = 0,2514x + 3,4778
R2 = 0,9888
CANT. ACUM. DISUELTA POR UNIDAD DE ÁREA (mg/cm2)
TIEMPO (MIN)
0,00
10,00
20,00
30,00
40,00
50,00
60,00
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150

FIG.54