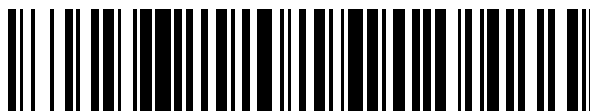


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 221**

51 Int. Cl.:

**C07D 237/32** (2006.01)

**A61K 31/502** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11710423 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2542535**

54 Título: **Formas cristalinas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica (sal sódica 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona), preparados farmacéuticos que la contienen y método de producción**

30 Prioridad:

**25.11.2010 EP 10075744**

**01.03.2010 EP 10002067**

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

**20.08.2014**

73 Titular/es:

**METRIOPHARM AG (100.0%)**

**Bleicherweg 45**

**8002 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**BREU, JOSEF;**

**BRYSCH, WOLFGANG;**

**KAISER, ASTRID;**

**LUDESCHER, BEATE;**

**MAASS, GERRIT;**

**MARTIN, THOMAS;**

**MILIUS, WOLFGANG y**

**NIEDERMAIER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 487 221 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formas cristalinas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4- diona sal sódica (sal sódica 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4- diona), preparados farmacéuticos que la contienen y método de producción

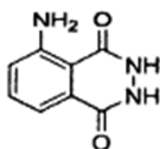
Sector técnico de la invención

- 5 La presente invención consiste en la puesta a disposición de al menos dos nuevas formas cristalinas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica (o sal sódica 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) con propiedades ventajosas de los preparados farmacéuticos que la contengan así como procedimientos para su producción.

- 10 La invención es relativa especialmente a la puesta a disposición de dos nuevas formas cristalinas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica con propiedades estimulantes y supresoras del sistema inmunológico con fines médicos.

Trasfondo del descubrimiento

- 15 Desde hace mucho tiempo se conocen (actual estado de la técnica) enlaces químicos de efectos inmunomoduladores. Entre estos enlaces cuenta el 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica de la presente invención, el cual, por ejemplo es conocido del EP 1 203 587 A y posee la siguiente estructura básica (Na+ no mostrado):



- 20 La estructura básica arriba mostrada se denomina luminol. Partiendo del estado de la técnica se conoce que el 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas cristaliza como sustancias sólidas en diversas formas de hidrato. En el estado actual de la técnica se describen especialmente el dihidrato de sal sódica (RU 2113222 C1) y un trihidrato de sal potásica así como formas mixtas (RU 2211036 C2).

Se sabe que las formas cristalinas de una sustancia pueden divergir en sus propiedades físicas como solubilidad, velocidad o tasa de disolución, estabilidad, etc. (Haleblian and McCrone (1969): Journal of Pharmaceutical Sciences, 58:911-929.).

- 25 Semejantes propiedades pueden influir sobre el procesamiento farmacéutico de la sustancia activa y sobre su disponibilidad biológica y, por ende, sobre su efectividad biológica (comp. Griesser (2006) en: Polymorphisms in the Pharmaceutical Industry. Hilfiker (Ed.) 211-234).

- 30 Para la producción de medicamentos es importante que la sustancia de partida sea estable, no absorbente de agua, y que su comportamiento en estado sólido se pueda controlar a lo largo de todo el proceso de producción. Además la estabilidad química y la estabilidad de la fase sólida así como la aptitud del almacenamiento prolongado de una sustancia activa son de extraordinaria importancia (comp. Miller et al. (2006) en: Polymorphisms in the Pharmaceutical Industry. Hilfiker (Ed.) 385-403). A este respecto es deseable que también se preserven durante un tiempo de almacenamiento prolongado las propiedades físicas de la sustancia activa. Esto es relativo, por ejemplo a la higroscopicidad, la solubilidad o la velocidad de disolución inicial de la sustancia activa.

- 35 La US 6.489.326 B1 describe un procedimiento para la producción de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica con fines médicos que tiene por resultado una forma de dihidrato. La desventaja de este procedimiento es el empleo de un catalizador de metales pesados que puede dejar residuos en el producto. Los productos con residuos cuentan con potencial alérgico y la EMEA, en general, los contempla críticamente con vistas al empleo farmacéutico der EMEA (comp. directiva EMEA/CHMP/SWP/4446/2000).

- 40 Para el procesamiento farmacéutico y el empleo médico son muy importantes los métodos o procesos que hacen posible de un modo fiable y reproducible la producción de las formas cristalinas que se desean. En la producción de las formas cristalinas ha de considerarse que tan sólo ya leves divergencias de los parámetros del proceso causan modificaciones en la estructura cristalina del producto y, por ende, pueden tener como consecuencia otras formas cristalinas o bien formas mixtas. Las propiedades modificadas de este modo, por ejemplo una efectividad biológica modificada por otro tipo de solubilidad, pueden suponer el desecho de lotes completos, y así dejaría de ser posible la producción de la forma deseada (comp. Ulrich y Jones (2005): Nachrichten aus der Chemie 53: 19-23). Además de la pureza de la sustancia activa y de las modificaciones resultantes de la efectividad a este respecto también pueden quedar negativamente afectadas demás importantes propiedades con vistas al procesamiento farmacéutico, por ejemplo la aptitud de la compresión de tabletas puede quedar afectada por la fluidez o la velocidad de flujo de la forma cristalina. 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas forman parte del grupo de las aminofthalhidracidas y se describen en la técnica actual como inmunomoduladores con propiedades especiales antiinflamatorias, antioxidativas y antitóxicas (comp. US 6.489.326 B1; EP 0617024, US 5.512.573, US 5.543.410 A, US 7.326.690 B2).

Las sustancias inmunomoduladoras se dividen según sus efectos en inmunosupresoras e inmunoestimulantes (comp. Rote Liste Service GmbH (2011): [www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de))

Los preparados correspondientes de efecto exclusivo inmunosupresor o inmuno-estimulante como, por ejemplo, los preparados antagonistas del TNF alfa inmunosupresores o los preparados inmunoestimulantes de interferón beta causan frecuentemente (por sus efectos especiales) considerables efectos secundarios no deseables en el organismo. Algunas conocidas sustancias inmunosupresoras como, por ejemplo, los antagonistas del TNF alfa adalimumab, inhiben con precisión ciertos mediadores inflamatorios. Semejantes terapias suponen, según se sabe, graves efectos secundarios (comp. Descotes (2008): Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., 4:12:1537-1549), ya que los bloqueos de mediadores inflamatorios concretos suponen una intervención grave en el complejo sistema inmunológico. Como consecuencia de esto, el organismo no puede ya cumplir su función, es decir, reaccionar autónomamente y de un modo fisiológicamente apropiado a estímulos causantes de inflamaciones tanto exógenos como endógenos como, por ejemplo, las infecciones bacterianas. Así, por ejemplo, el empleo de antagonistas TNF alfa es contraindicado en el caso de infecciones graves y esto es especialmente a tener en cuenta en los casos de septicemia y tuberculosis. Así pues, antes de la prescripción de una medicación de este tipo como, por ejemplo, en el tratamiento de la artritis reumatoide, es sumamente aconsejable llevarse una detección de la tuberculosis a cabo (comp. Diel et al. (2009): Z Rheumatol 5:411-416). Además Hoffmann (2005: Intensivmed 42:371-377) pudo mostrar manifiestamente que los antagonistas de TNF alfa no son apropiados para el empleo clínico en caso de estados sépticos, pues incluso pueden tener como consecuencia un aumento de la mortalidad.

Las propiedades especiales inmunomoduladoras de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas se muestran por el contrario sumamente prácticas a la hora de combatir las llamadas tormentas de citoquinas (comp. Suntharalingam et al. (2006): N Engl J Med 355; 1018-28) a consecuencia de inmunorreacciones intensas, pues, a diferencia de los llamados antagonistas de las citoquinas, estas sales carecen prácticamente de efectos secundarios ya que no tienen lugar la inhibición de citoquinas particulares sino que éstas se regulan hasta un nivel fisiológico; de este modo se consigue una reacción adecuada del organismo a los gérmenes infecciosos. Por lo demás, según el estado de la técnica, se muestran ciertas formas cristalinas de sales alcalinas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sin efectos inmuno-específicos diferentes. Sobre todo según el estado de la técnica no puede determinarse si algunas formas cristalinas pueden emplearse con precisión y según las indicaciones, es decir, según su efecto principal subyacente inmunomodulador y preferentemente como inmunosupresoras o preferentemente como estimulantes del sistema inmunológico.

Un empleo médico especial de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica se describe en US2003/0195183 A1 con la „corrección del sistema inmunológico“ gracias al empleo de diferentes dosis (de 0,2 µg hasta 1.000 mg) de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas en diversos experimentos. La dosificación efectiva dentro de esta gama varía dependiendo de la enfermedad investigada y de los parámetros individuales como, por ejemplo, especie, edad, sexo y peso. Así, por ejemplo, el empleo de diferentes dosis entre 2 y 200 µg de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica es de diferentes efectos en la inmunorreacción celular a la inyección subcutánea de eritrocitos en ratones (reacción hipersensible retardada, DHR). Cuanto menor sea la dosis empleada tanto mayor es el índice DHR. En el más sensitivo de los dos clanes de ratones empleados, la mayor dosis empleada tuvo como consecuencia una inhibición de DHR. Éste y otros ejemplos en vivo, in vitro y clínicos de US2003/0195183 A1 muestran por lo demás que las dosis bajas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas son sobre todo de efectos estimulantes del sistema inmunológico mientras que las altas dosis de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas son ante todo de efectos inmunosupresores. Puesto que el paso de la dosificación inmuno-estimulante a la inmunosupresora en diferentes clanes de ratones es de una intensidad igualmente diferente, cabe esperar también en el tratamiento médico y veterinario de diversas especies e individuos efectos relativos a la genética de la población de lo cual se derivan peligros especiales de este empleo con diferentes dosis.

Sería una ventaja clínica, especialmente en el combate de enfermedades graves con inmunodeficiencia congénita o adquirida o con inmunorreacción excesiva un método por medio del cual se controlase prácticamente la inmunomodulación poniendo a disposición simplemente diversas formas de una sustancia.

La propiedad de un inmunomodulador preferentemente estimulante es deseable, por ejemplo, para el tratamiento de pacientes con sistema inmunológico debilitado como es el caso en las infecciones con VIH o de los tratamientos quimioterapéuticos.

La propiedad preferentemente supresora de un inmunomodulador es deseable, por ejemplo, para reducir al mínimo procesos inflamatorios como sucede en los casos de las operaciones quirúrgicas, las enfermedades autoinmunes y las alergias.

En la praxis clínica se emplean terapéuticamente con frecuencia en ciertas indicaciones, especialmente en las enfermedades inflamatorias recidivantes, tanto estimulantes del sistema inmunológico como inmunosupresores al mismo tiempo o bien alternadamente (comp. DMSG 2006: Aktuelle Therapieempfehlungen September 2006; Rote Liste Service GmbH (2011): [www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de)). Esto tiene como consecuencia un aumento del peligro de efectos alternantes. Las sustancias de una misma clase químicamente semejantes con la propiedad de desarrollar efectos contrarios ofrecerían por tanto una ventaja clínica ya que cabe esperar que provoquen en el

organismo menos efectos farmacológicos alternantes con la toma simultánea o no simultánea que las sustancias activas de diferentes clases que se emplean con el mismo cometido.

5 Una desventaja de lo que ofrece el actual estado de la técnica consiste por lo demás en que la aplicación dependiente de la dosis de un inmunomodulador requiere más atención del personal médico o del paciente y, por ende, aumenta el riesgo de cometerse errores en la aplicación.

Por esto es deseable un empleo inmunológico específico no solamente dependiente de la dosis de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sales alcalinas para el tratamiento practicable y de escasos riesgos que simultáneamente aproveche exhaustivamente las ventajas médicas de esta clase de sustancias.

10 Ha de seguir observándose que la intervención en el mecanismo del sistema inmunológico puede ser de graves consecuencias para el organismo afectado. Tanto más importante es, pues, para la aplicación médica los inmunomoduladores de efectos secundarios tan reducidos como sea posible y de un efecto inmunológico tan claramente definido como sea igualmente posible, gracias a lo cual sería posible la profilaxis o la terapia precisas de enfermedades inmunológicas. Semejantes inmunomoduladores serían de gran importancia para la medicina.

Resumen de la invención

15 La presente invención se ha realizado ante el telón de fondo del presente estado de la técnica descrito, a lo cual el cometido de la presente invención consistía en poner a disposición nuevas formas de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica de efectos inmunológicos específicos y delimitables entre sí y que pudieran aplicarse con precisión preferentemente de modo inmunosupresor o preferentemente de modo imunoestimulante. En tanto propiedad especialmente deseable, estas nuevas formas habrían de mostrar  
20 independientemente de la dosis efectos preferentemente estimulantes del sistema inmunológico o ante todo inmunosupresores. Por lo demás las formas puestas a disposición presentarían propiedades físico-químicas que serían ventajosas para los medicamentos producidos con ellas y ello, a saber, medicamentos concretos o en combinación y/o almacenados o empleados.

25 El cometido se realizó poniendo a disposición dos nuevos anhidratos de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica (formas de anhidratos I y II), los cuales, sorprendentemente, partiendo de los datos experimentales, se diferencian, como se ha comprobado, del estado actual de la técnica por sus propiedades físico-químicas e inmunomoduladoras delimitables entre sí, especialmente de la conocida 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica. Mientras que la forma de anhidrato I (→forma cristalina I) de la invención dispone de propiedades  
30 inmunomoduladoras, especialmente ante todo estimulantes del sistema inmunológico, la nueva forma de anhidrato II de la invención (→forma cristalina II) cuenta con propiedades inmunomoduladoras y de modo especial, ante todo, inmunosupresoras.

Las formas cristalinas I y II se definen cada una por 10 valores característicos en distancias interplanares y 2 valores angulares theta, lo cual se expresa en sendos difractogramas de polvo de rayos X (fig. 2 y fig. 3).

35 Los inventores han descubierto que las formas I y II disponen de propiedades físicas positivas relativas al procesamiento farmacéutico y a la aplicación, incluyendo la estabilidad, la resistencia al almacenamiento, la no higroscopicidad y la solubilidad. Éstas propiedades son ventajosas para la producción farmacéutica y el post-procesamiento en comparación con los dihidratos, por ejemplo, en los que puede darse una modificación del contenido de agua y, por causa de ello, problemas de la receta, por ejemplo por causa de modificaciones del peso de la sustancia activa durante la compresión de las tabletas, el encapsulado o la esterilización. Se dan  
40 diferencias en las propiedades físicas de las formas de la invención y lo que ofrece el estado actual de la técnica, por ejemplo en lo tocante a la solubilidad (comp. tabla 6).

Los inventores han pretendido, por lo demás, poner a disposición un procedimiento que posibilite la practicabilidad y reproductibilidad de las formas de anhidratos según la invención 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica. Los procedimientos perfilados deberían ser posibles sin el empleo de catalizador de  
45 metales pesados y con la posibilidad de producción reproducible de la nueva forma cristalina II para los tamaños que se deseen. Por lo demás los inventores pretenden poner a disposición procedimientos para la producción de las formas cristalinas I y II con propiedades ventajosas en relación al procesamiento farmacéutico y diversos modos de aplicación.

50 Este cometido se ha cumplido al menos con un procedimiento para producir discrecionalmente la forma cristalina I o II, en el que hidróxido de sodio y luminol se disuelven en agua. Añadiendo un alcohol de bajo peso molecular, preferentemente etanol o 2-propanol, se decanta el luminol de la sal sódica. La forma cristalina deseada I o II se obtiene tras el aislamiento y repetida purificación, enjuague o lavado así como observando una duración determinada de removimiento o agitación. Los procesos relativos al invento pueden emplearse para las cantidades que se deseen.

55 Como punto de partida de la fabricación de ambas formas cristalinas sirve luminol tan puro como sea posible o un procedimiento para la producción del mismo por reducción de ácido 3-nitroftálico en medio alcalino con un agente reductor apropiado a través de 3-hidruro nitroftálico. Puede proseguirse con una depuración por medio de recristalización.

La presente invención abarca finalmente preparados farmacéuticos de las formas I o II o una combinación de ambas, en cada caso solas o junto con sustancias auxiliares apropiadas para fines farmacéuticos.

Descripción breve de las ilustraciones:

La figura 1 muestra la toma de barrido electrónico de la forma I (arriba) y la forma II (abajo).

5 La figura 2 describe un difractograma de polvo de la forma cristalina I.

La figura 3 describe un difractograma de polvo de la forma cristalina II.

La figura 4 describe la velocidad o tasa de disolución de las formas I y II en agua a través del tiempo (20 minutos). La forma I se representa por la línea inferior de ambas, la forma II por la línea superior.

Descripción en detalle

10 Si no se especifica de otro modo, los conceptos técnicos y científicos empleados en la presente exposición de invención tienen el significado con el que los especialistas los emplean en el sector técnico correspondiente.

Un "organismo" es un ser vivo, especialmente un ser humano o un animal dotado de un sistema inmunológico autorregulable.

El concepto de "sustancia activa" abarca la forma cristalina I o la forma cristalina II o una mezcla de ambas.

15 El concepto de "preparado farmacéutico" abarca la sustancia activa en cualquier dosis y forma de toma definidas y farmacológicamente adecuadas como, por ejemplo, en polvo, suspensión, emulsión y/o combinados de ellos. Abarca sustancias auxiliares farmacéuticas apropiadas así como todas aquellas sustancias que directa o indirectamente vienen a ser una combinación, acumulación o complejo o de los componentes o bien consecuencia de otras reacciones o interacciones así como demás sustancias activas solas o en combinación.

20 Según la invención, los preparados farmacéuticos de la sustancia activa motivo de la invención bien solos o en combinación con otros coadyuvantes y terapias estándares pueden tomarse en forma líquida o sólida y de cualquier modo médicamente aceptable, preferente aunque no exclusivamente por vía intravenosa, intramuscular, tópicamente (por ejemplo, gotas para los ojos), subcutánea, transdermal, vaginal, rectal u oral, también sublingual y bucal, así como en forma de implantes con elución. Las formas líquidas pueden ser, por ejemplo, soluciones (como las destinadas a las inyecciones e infusiones), suspensiones, emulsiones, sprays, lociones y cremas. Las formas sólidas pueden ser: tabletas, grageas, cápsulas, polvo y otras formas habituales para el especialista y apropiadas como, por ejemplo, supositorios.

25 La expresión "sustancia auxiliar" se sigue empleando para describir aquel componente de un preparado farmacéutico junto a la sustancia activa. La elección de una sustancia auxiliar apropiada depende de factores como el tipo de aplicación y la dosificación así como de la aptitud de influir sobre la solubilidad y la estabilidad del preparado por medio de la sustancia auxiliar misma.

30 Las "sustancias auxiliares" farmacéuticas son sustancias que el especialista conoce o que pueden consultarse en las obras estándar de la ciencia farmacéutica o de los libros oficiales sobre fármacos (por ejemplo la farmacopea europea). Semejantes sustancias pueden influir, por ejemplo, en el reparto de la sustancia activa en diversos tejidos y órganos o bien modificar la duración o rapidez del efecto de formas de fármacos, por ejemplo acelerando la absorción (por ejemplo a través de dimetilsulfóxido, el ácido nicotínico, la hialuronidasa) o retardando el inicio de efecto por medio de preparados de retardo apropiados.

35 Las sustancias auxiliares farmacéuticas a emplear en la forma de aplicación dependiente del tipo de aplicación deseado pueden ser, por ejemplo: citrato de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio junto con el medio apropiado de ruptura de la tableta como es el caso en la aplicación oral. Cabe contemplar a este respecto sustancias que por medio de la absorción de agua se hinchan (almidón, derivados de la celulosa, alginatos, polisacáridos, dextranos, polivinilpirrolidona reticulada), sustancias que por medio de reacciones químicas con el agua producen gas (bicarbonato sódico, ácido cítrico y ácido tartárico) o sustancias que en tanto agente de hidrofiliado mejoran la irrigación de los cristales y, por ende, median en su disolución en agua (por ejemplo polietilenglicol-sorbitán-ésteres de ácidos grasos).

40 Las sustancias auxiliares son también sustancias que se pueden emplear en tanto agente aglutinante como, por ejemplo, almidón, gelatina, glúcidos, derivados de la celulosa o en tanto diluyentes como, por ejemplo, los glúcidos. Por lo demás las sustancias surfactantes, por ejemplo, el laurilsulfato de sodio o el polisorbato 80 o un agente lubricante como, por ejemplo, el estearato de magnesio, estearato de sodio así como, por lo demás, los aromatizantes, antioxidantes, colorantes y conservantes que el especialista considere apropiados.

45 El concepto de "sustancialmente puro" significa una pureza de la sustancia activa de mínimamente el 95%, preferentemente del 98%, y máximamente preferente del 99% de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica.

50 El concepto de "inmuno-específico" significa el empleo preciso de la forma I y/o la forma II para el tratamiento de enfermedades con transfondo inmunodeficiente o un sistema inmunológico excedentario.

55

El concepto de "efecto" describe el modo de actuar específico, en este contexto inmunoespecífico, de una sustancia activa en el marco de esta invención mayormente con estimulantes del sistema inmunológico o efecto inmunosupresor.

Nuevas formas cristalinas I y II de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica

- 5 La presente invención contiene una nueva forma cristalina de anhidrato I de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica caracterizada por un diagrama de curvatura de polvo de rayos X de un difractor Bragg-Brantano (Panalytical X'Pert Pro) de un largo de onda de  $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$  dotado de un detector X'Celetor Scientific RTMS empleando una radiación de cobre filtrada con níquel Cu K( $\alpha$ ) que se expresa en los valores D o 2- theta, a lo cual con „D“ se denominan las distancias interplanares (tabla 1) y con „2-theta“ el ángulo 2-theta en grados. I (rel) indica las intensidades relativas de los reflejos (tabla 2).

Tabla 1: valores D de la forma de anhidrato I:

	13,51	6,94	5,24	4,59	3,89	3,45	3,35	3,28	3,11	2,95
Valores redondeados	13,5	6,9	5,2	4,6	3,9	3,5	3,4	3,3	3,1	3,0

Tabla 2: valores 2-theta de la forma de anhidrato I e intensidades relativas I(rel),

2 $\Theta$	6,5	12,7	16,9	19,3	22,8	25,8	26,6	27,2	28,7	30,3
I/Io(rel)	vst	st	m	w	w	m	st	st	m	m

Explicación de las siglas: w= weak, m= medium, st= strong y vst= very strong.

- 15 La presente invención contiene por lo demás una nueva forma cristalina de anhidrato II de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica caracterizada por un diagrama de curvatura de polvo de rayos X de un difractor Bragg-Brantano (Panalytical X'Pert Pro) de un largo de onda de  $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$  dotado de un detector X'Celetor Scientific RTMS empleando una radiación de cobre filtrada con níquel Cu K( $\alpha$ ) que se expresa en los valores D o 2- theta, a lo cual con "D" se denominan las distancias interplanares (tabla 3) y con "2-theta" el ángulo 2-theta en grados. I (rel) indica las intensidades relativas de los reflejos (tabla 4).

Tabla 3: valores D de la forma de anhidrato II:

	12,92	7,88	7,08	6,47	5,32	3,96	3,66	3,57	3,27	3,21
Valores redondeados	12,9	7,9	7,1	6,5	5,3	4,0	3,7	3,6	3,3	3,2

Tabla 4: valores 2-theta de la forma de anhidrato II e intensidades relativas I(rel),

2 $\Theta$	6,8	11,2	12,5	13,7	16,7	22,4	24,3	24,9	27,2	27,8
I/Io(rel)	vst	w	m	st	m	w	w	w	m	st

Explicación de las siglas: w= weak, m= medium, st= strong y vst= very strong.

- 25 Propiedades físicas ventajosas:

Ambas formas relativas a la invención pueden diferenciarse entre sí por la vista del microscopio de barrido electrónico: así pues presenta la forma II sobre todo cristallitos semejantes a agujas de estructura octaédrica de varios micrómetros de largo y sobrepuestos en estratos, mientras que en REM la forma I mayormente presenta cristallitos morfológicamente heterogéneos con cantos redondeados que se aglomeran en forma de polvo (fig. 1). De la forma cristalina resultan para las formas relativas a la invención propiedades ventajosas con vistas al procesamiento farmacéutico: así pues la forma II, por causa de la forma de sus partículas cristalinas, presenta frente a la forma I una mayor fluidez y, por ende, una mejor aptitud para el filtrado, mientras que la forma I, especialmente por causa de su densidad aparente superior, es mejor para la compresión de tabletas, lo cual se favorece también gracias a su inclinación a aglomerarse, lo cual posiblemente suceda como consecuencia de la adhesión de sus estructuras de láminas.

- 35 Ambas formas cristalinas son estables durante un espacio temporal mínimo de dos meses a temperatura ambiente (25°C) y 40°C y se descomponen a partir de 335°C  $\pm$  10°C (forma I) o bien 385°C  $\pm$  10°C (forma II) mientras que en el dihidrato según US 6,489,326 B1 tan sólo ya a 85°C se observa una conversión de la fase sólida endotérmica (tabla 5). La conversión de la fase sólida del dihidrato a según US 6,489,326 B1 se midió por medio de termogravimetría / termoanálisis diferencial simultáneos en un Linseis L81-077 acoplado a una medición de espectrometría de masa con un Netzsch STA 449 C, termo-báscula, con acoplamientos MS y FTIR a más de 30-300°C bajo helio. La temperatura de descomposición de las formas I-II se determinaron con el mismo aparato a más de 30-500°C en aire sintético (4 N<sub>2</sub> : 1 O<sub>2</sub>). Los datos fueron evaluados con el software de fábrica Proteus.

- 45 Tabla 5: temperatura de descomposición forma I-II y la determinación de la conversión de la fase sólida del dihidrato s según US 6,489,326 B1

Forma I	Forma II	Dihidrato US 6,489,326 B1
335°C ± 10°C	385°C ± 10°C	85°C ± 10°C

Los datos termoanalíticos confirman la suposición de los inventores, según la cual ambas formas cristalinas son de propiedades ventajosas en relación a la estabilidad y la buena aptitud de almacenamiento. Estas propiedades favorecen por lo demás el procesamiento de los productos farmacéuticos de las formas cristalinas I y II relativas a la invención en comparación con el dihidrato de la US 6,489,326 B1, ya que éstas las hacen insensibles en comparación con las fases de procedimiento con un alto aporte de energía, por ejemplo esterilización o molienda.

Por lo demás se muestran ambas formas cristalinas I y II substancialmente estables en relación a la modificación del contenido de agua, de modo que los problemas de receta por causa de las modificaciones del peso de la substancia activa en el post-procesamiento farmacéutico (por ejemplo producción de tabletas, encapsulado, etc.) queda reducido.

Por lo demás se determinó la solubilidad de las formas cristalinas en una solución saturada. Según esto la forma II es más fácilmente soluble que la forma I; ambas formas, por su parte, son considerablemente más solubles que el dihidrato según US 6,489,326 B1. Las nuevas formas cristalinas suponen una ventaja respecto del estado actual de la técnica, ya que posibilitan una mayor y una buena solubilidad máxima en soluciones para inyecciones de reducido volumen de inyección y esto, en el caso de los preparados tópicos como, por ejemplo, las cremas con un reducido contenido de agua, supone una mejor aptitud de procesamiento.

Tabla 6: vista sinóptica de la solubilidad de las formas I y II en agua a temperatura ambiente en comparación con el dihidrato US 6,489,326 B1 que se produce según US 6,489,326 B1.

Forma I	Forma II	Dihidrato /US 6,489,326 B1
227 mg/mL	252 mg/mL	168 mg/mL

La mejor solubilidad en la comparación de la forma II se apoya también en los datos de la velocidad o tasa de disolución inicial. Estos datos proceden de una medición in situ ATR-IR con intervalos de medición de 15 segundos cada uno, a lo cual las formas I y II se añadieron 5 minutos tras el comienzo del registro. La solución completa de 0,25 g de la forma I o bien de la forma II en 10 mL H<sub>2</sub>O VE se consiguió agitando (500 revoluciones por minuto) a 25°C. Se mostró que la velocidad o tasa de disolución de la forma II en los primeros minutos tras el añadido en una solución acuosa es superior que la de la tasa de la forma I, la cual consiguió después su completa concentración equilibrada. Las diferentes solubilidades así como las velocidades o tasas iniciales de disolución de las formas I y II (fig. 4) pudieran explicarse por la diferencia de las estructuras de sus superficies (fig. 1). Los pequeños cristales redondeados morfológicamente heterogéneos de la forma I suponen una estructura superficial tendencialmente más compacta que la de los cristales octaédricos de la forma II, que por causa de su forma ofrecen una mayor superficie de acceso a los agentes diluyentes. Las diferentes velocidades o tasas iniciales de disolución dadas en las formas I y II son importantes especialmente respecto de la producción de recetas orales ya que una velocidad o tasa de disolución inferior, como en la forma I es ventajosa siempre que se pretenda que la emisión de la substancia activa se realice con retardo (recetas *retard*). Una velocidad o tasa de disolución mayor, como en el caso de la forma II, es ventajosa para las recetas de medicaciones orales para casos agudos, en las que es deseable una bio-disponibilidad tan rápida como sea posible.

Las diversas estabilidades térmicas de las formas I y II se fundamentan en las diversas coordinaciones estequiométricas de los cationes de sodio y de las moléculas de luminolat. Mientras en la forma I un catión de sodio a través de enlaces puente intermoleculares de hidrógeno coordina un total de 6 moléculas de luminolat en un prisma trigonal, en la forma II son tan sólo 4 moléculas de luminolat las cuales se ordenan tetraédricamente a través de enlaces puente intermoleculares de hidrógeno. De esto resulta que en la forma II se da una coordinación térmica tendencialmente más favorable y estable que en la forma I.

Empleo médico:

Sorprendentemente, en estudios experimentales in vitro e in vivo, los inventores encontraron una diferencia perceptible del efecto inmunológico entre de las formas cristalinas I y II.

Por lo demás se encontró que las formas I y II, por causa de sus diferentes efectos inmunomoduladores, pueden emplearse específicamente superando el estado actual de la técnica: mientras que la forma II muestra un efecto inmunomodulador ante todo supresor respecto de las citoquinas, la forma I muestra ante todo un efecto inmunoestimulante respecto de ciertas citoquinas. La forma II es, pues, apropiada especialmente para el empleo terapéutico en estados de inmunorreacción excesiva, la forma I es apropiada especialmente para el empleo terapéutico en indicaciones con un transfondo de inmunodeficiencia.

Ya en el caso de enfermedades crónicas (por ejemplo esclerosis múltiple, hepatitis C, enteritidis crónica y colitis) en que el estado inmunológico del paciente puede modificarse una y otra vez de tal modo en que los cambios de

terapias estimulantes del sistema inmunológico a terapias inmunosupresoras o de inmunosupresión a inmunostimulación o una toma combinada o retardada ambos enfoques parecen razonables (comp. DMSG 2006: Aktuelle Therapieempfehlungen September 2006). Por este motivo semejantes enumeraciones pueden contemplarse sólo a modo de ejemplo, la asignación de una enfermedad a estados con inmunorreacciones

5 excesivas no excluye su tratamiento con la forma II o con combinaciones de la forma I y la forma II y la asignación de una enfermedad a estados con transfondo inmunodeficiente no excluye su tratamiento con la forma I o con combinaciones de la forma I y la forma II.

En tanto estado con inmunorreacciones excesivas cabe nombrarse ejemplarmente las reacciones de rechazo tras transplantaciones, enfermedades autoinmunes activas (especialmente artritis reumatoide activa, esclerosis

10 recidivante múltiple, hepatitis lupoide, poliarteritis nodosa, morbus Crohn, colitis ulcerosa, dermatomiositis, morbus Behcet, morbus Behcet Uveitis, púrpura trombocitopénica, miastenia grave, polimiositis, psoriasis, artritis psoriásica, morbus Bechterew, hemoglobinuria paroxística nocturna, espondilitis anquilosante, tiroiditis autoinmune, etc.), anemia aplásica, pénfigo, penfigoide, uveítis endógena, síndrome nefrótico y dermatitis atópica así como preferentemente estados sépticos desencadenados por infecciones bacterianas con patógenos

15 gramnegativos y grampositivos como, por ejemplo, por MRSA (aureus resistente a la meticilina) y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) causado por otros factores (por ejemplo inmunológicos o químicos).

En tanto estados con transfondo inmunodeficiente cabe mencionar a modo de ejemplo los frecuentes patógenos gripales, infecciones de las vías respiratorias recurrentes, patógenos recurrentes de las vías de evacuación

20 urinarias, cansancio, debilidad, perturbaciones de la concentración de causa desconocida, convalecencia, infecciones víricas crónicas (especialmente VIH, hepatitis B, hepatitis C, encefalitis, herpes zoster, herpes simplex, infecciones del oído interno, varicela, sarampión, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr), diversas enfermedades oncológicas (especialmente leucemia de células pilosas, leucemia mielode, mieloma múltiple, linfomas foliculares, sarcoma de Kaposi, linfoma cutáneo de células T, carcinoma nasofaríngeo, carcinoide, carcinoma renal, carcinoma de vejiga, carcinoma de células basales, carcinomas metastásicos y preferentemente melanoma maligno), granulomatosis séptica, neutropenia, verrugas genitales, queratosis,

25 enfermedades autoinmunes (especialmente estadios no activos como, por ejemplo, esclerosis recidivante múltiple entre las recaídas), colitis radiogénica, enfermedad diverticular, alergias (especialmente la fiebre del heno, erupción polimorfa lumínica, eccema, neurodermatitis), enteritis, colitis, así como con especial preferencia de forma concomitante antes, durante y después de la quimioterapia y radioterapia.

Sorprendentemente los inventores pudieron mostrar diferentes efectos simplemente poniendo a disposición formas de cristales específicas 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica, preferentemente de formas

30 múltiples del anhidrato, especialmente preferible de las formas I y II. Esto permite un empleo inmunomodular preciso con fines preferentemente estimulantes del sistema inmunológico (forma I) o preferentemente inmunosupresor (forma II), a lo cual ambas formas afectan en general regulando el sistema inmunológico. Así pues, sorprendentemente, los inventores pudieron demostrar in vitro e in vivo efectos estimulantes del sistema

35 inmunológico de la forma I.

La forma II muestra, por el contrario, propiedades inmunomoduladoras, que surten efecto ventajosamente en los macrófagos activados. Los inventores pudieron demostrar especialmente, ante todo, propiedades

40 inmunosupresoras de la forma II partiendo de experimentos in vitro con LPS estimulantes de macrófagos. A este respecto tiene lugar un considerable descenso de los valores IL-6. En los experimentos in vivo con ratones (modelo de septicemia con *S. pyogenes*) pudo demostrarse igualmente un considerable efecto terapéutico de la forma II.

Por lo demás, los inventores pudieron mostrar partiendo de la evolución del peso y de los valores enzimáticos del hígado de ratones sanos que las nuevas formas I y II no presentan toxicidad alguna o sólo toxicidad muy

45 reducida. Ambas formas son de efecto inmunomodulador sin que, por otra parte, sean de efecto exclusivo estimulante del sistema inmunológico o de efecto exclusivamente inmunosupresor. Tanto la forma I como la forma II tienen por consecuencia en el modelo de septicemia una tasa de supervivencia superior.

Los inventores parten de la suposición de que también un empleo combinado, preferentemente retardado o diferido de las formas I y II puede ser prometedor y que un empleo combinado puede ser ventajoso en ciertos

50 casos en comparación con el empleo exclusivo en relación a ciertas indicaciones, especialmente (aunque no exclusivamente) en el caso de las enfermedades autoinmunes.

#### **Ejemplo 1 - efecto de la forma I en macrófagos murinos estimulados LPS in vitro**

En un experimento con macrófagos de ratón aislados ha de registrarse in vitro el efecto inmunomodulador de la forma I partiendo de la concentración medida en los excedentes de alfa TNF o IL-6. Para ello los macrófagos se

55 trataron primeramente con la forma I (20 o 200 µg/mL). Tras una hora los macrófagos tratados se estimularon con LPS (10, 100 o 1000 ng/mL). Los excedentes se colectaron 24 horas después y se midió la concentración en alfa TNF y IL-6. En tanto ejemplares de control se tomaron los macrófagos no estimulados, macrófagos no estimulados tratados con 200 µg/mL de la forma I así como macrófagos estimulados LPS (10, 100 o 1000 ng/mL LPS). Los valores medidos pueden consultarse en la tabla 7.

60 Los valores de medición alfa TNF de la tabla 7 muestran con una sola toma de LPS (en concentraciones de 1 µg/mL, 100 ng/mL y 10 ng/mL) una estimulación por medio de LPS dependiendo de la dosis.



Tabla 7:

	Dosis	LPS	Alfa TNF (ng/mL)		IL-6 (ng/mL)	
			MW	STD	MW	STD
Forma I	20 µg	1 mg/mL	47,91	3,89	22,67	2,21
	200 µg	1 mg/mL	32,53	4,44	15,95	3,84
	20 µg	100 ng/mL	27,17	4,77	19,67	3,76
	200 µg	100 ng/mL	16,47	4,07	10,88	2,09
	20 µg	10 ng/mL	13,27	5,99	6,05	4,30
200 µg	10 ng/mL		20,74	7,57	7,19	5,56
Control I (no estimulado)			0,00	0,00	0,00	0,00
Control II (200 µg/mL forma I)	200 µg/mL		7,98	6,53	0,24	0,41
Control III (1 µg/mL LPS)		1 µg/mL	50,97	6,59	28,62	2,07
Control III (100 ng/mL LPS)		100 ng/mL	32,32	2,10	26,97	4,42
Control III (10 ng/mL LPS)		10 ng/mL	25,36	5,61	27,70	4,02

5 En los grupos de combinación de macrófagos tratados con LPS y con la forma I se mostró en todos los grupos LPS un efecto inmunosupresor de la forma I dependiendo de la dosis. Éste fue más significativo en la combinación de macrófagos tratados con la forma I, 100 ng/mL, estimulados con LPS y con 200 µg/ml, seguido de una significativa reducción de los valores alfa TNF en la combinación de 1 µg/mL LPS con 200 µg/mL de la forma I.

10 Además en el grupo de control de los macrófagos no estimulados, tratados con 200 µg/mL, forma I, pudo observarse en los valores alfa TNF medidos un considerable efecto inmunomodulador, en este caso estimulante del sistema inmunológico.

### Ejemplo 2 - efecto de la forma II en macrófagos murinos estimulados LPS in vitro

15 En otro modelo in vitro con macrófagos de médula ósea (ratón) pudo confirmarse el efecto terapéutico inmunomodulador, sobre todo inmunosupresor, de la forma II. Para ello primeramente unos macrófagos de médula ósea de ratón aislados se trataron con la forma II en concentraciones de 2, 20 o 200 µg/mL correspondientemente y una hora tras el tratamiento fueron estimulados con 100 ng/mL o 10 ng/mL de LPS. Los excedentes se colectaron 24 horas más tarde y la concentración de alfa TNF y IL-6 se midió. A modo de control servían macrófagos no estimulados; macrófagos no estimulados se trataron con 200 µg/mL de la forma II así como macrófagos estimulados con LPS (10 o 100 ng/mL LPS). Los valores medidos pueden consultarse en la tabla 8.

Tabla 8:

	Dosis	LPS	N	Alfa TNF (ng/mL)		IL-6 (ng/mL)	
				MW	STD	MW	STD
Forma II	2 µg	100 ng/mL	7	7,40	3,49	2,67	0,76
	20 µg	100 ng/mL	9	9,06	1,36	4,28	0,54
	200 µg	100 ng/mL	9	7,69	1,62	4,00	1,20
	2 µg	10 ng/mL	9	8,38	1,76	3,93	1,01
	20 µg	10 ng/mL	9	9,80	0,72	1,61	1,30
	200 µg	10 ng/mL	6	6,76	1,60	3,42	1,29
Control (no estimulado)			9	0,00	0,00	0,00	0,00
Control (no estimulado)	200 µg		9	0,00	0,00	0,00	0,00
Control		100 ng/mL	9	12,46	1,70	4,47	1,67

Control		10 ng/mL	9	9,45	1,47	3,19	1,33
---------	--	----------	---	------	------	------	------

5 Pudo medirse una significativa reducción de la concentración TNF alfa en el grupo con macrófagos estimulados con 100 ng/mL LPS en todas las concentraciones de sustancia activa. En el grupo de los macrófagos estimulados con 10 ng/mL LPS se mostró una significativa reducción de alfa TNF en la mayor concentración de sustancia activa (200 µg/mL).

10 Además pudo observarse un efecto inmunosupresor de la forma II en macrófagos estimulados con LPS partiendo de significantes reducciones en el caso de los valores IL-6. Estos pudieron medirse tanto en la combinación de 2 µg/mL de sustancia activa con 100 ng/mL de macrófagos estimulados con LPS así como en el grupo de macrófagos estimulados con 10ng/mL con la concentración de sustancia activa de 20 µg/mL. Estos resultados concuerdan con los valores IL-6 procedentes de un experimento piloto anterior in vitro realizado con macrófagos, en el que se empleó otra combinación con LPS y con la sustancia activa (1 µg/mL LPS con 100 µg/mL) e igualmente se mostró un efecto inmunosupresor de la forma II en los macrófagos murinos estimulados. No pudo mostrarse efecto estimulante alguno del sistema inmunológico en macrófagos no inducidos con LPS.

**Ejemplo 3 – evolución del peso en ratones sanos**

15 En un modelo con ratones de la septicemia gram-positiva (infección con *S. pyogenes*) se probó la aptitud terapéutica de las formas cristalinas I y II des 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica. El suministro de la sustancia activa se realizó por vía parental 6 horas después de que tuviera lugar la infección. Un segundo suministro de sustancia activa se realizó 24 horas tras la primera aplicación. El experimento concluyó 48 horas tras la infección. Ambas formas (grupos sometidos a las sustancias) se emplearon es tres dosis diferentes.  
20 Cada uno de los ratones recibieron por toma 2, 20 o 200 µg de la forma I o de la forma II.

Además de los grupos sometidos a las sustancias (forma I y forma II) un grupo recibió una solución de sal de cocina (NaCl) en lugar de las sustancias activas disueltas y un grupo no contó con ningún tratamiento. En paralelo a los animales infectados se formaron grupos comparables con animales no infectados.

25 Cada uno de los grupos tratados se componía de 5 animales; a los de control no infectados se les suministró dos y a los de control infectados así como a cada grupo se les suministró cuatro veces la forma II, de modo que en total participaron 180 animales en el experimento.

Es conocido que en los experimentos con animales la toxicidad de las sustancias en el caso de los ratones o las ratas adolescentes puede afectar a la evolución del peso. La evolución del peso (en gramos) de los animales de control no infectados a lo largo de un espacio de tiempo de dos días se compila en la tabla 9.

30 Tabla 9

	Dosis	N	Evolución del peso/incremento (g)	
			MW	STD
Forma I	(total)	15	0,59	1,33
	2 µg	5	-0,49	0,81
	20 µg	5	1,48	1,58
	200 µg	5	0,79	0,73
Forma II	(total)	30	0,59	2,19
	2 µg	10	-0,14	1,79
	20 µg	10	1,43	2,14
	200 µg	10	0,50	2,52
NaCl	-	10	0,67	1,87
Control	-	10	0,68	1,93
Total	-	65	0,62	1,89

Entre los animales no infectados no se dio ningún caso de muerte. No pudieron constatarse diferencias en la evolución del peso entre los grupos. Por este motivo se parte de la suposición de que tanto la forma I como la forma II están libres de toxicidad o presentan una toxicidad muy leve.

35 **Ejemplo 4 - evolución del peso en ratones infectados**

En el modelo de septicemia descrito en el ejemplo 3 se comprobó la influencia de las formas cristalinas I y II de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica en lo relativo a la evolución del peso de ratones infectados con *S. pyogenes*. El desarrollo del peso corporal durante una infección aguda puede suministrar importantes indicios

con vistas al pronóstico. Algunos animales no sobrevivieron el segundo día ni por ende llegaron al final del experimento. En general la evolución del peso corporal del individuo durante las primeras 24 horas tras la infección viene a ser un indicio de la probabilidad de sobrevivir hasta el final del experimento tras 48 horas, sin embargo no se dio una relación significativa a este respecto. Puesto que respecto de los animales empleados en el transcurso del segundo día no se dispone de ningún dato sobre la evolución del peso a lo largo de todo el experimento, en la siguiente tabla (tabla 10) se representa, además de la evolución del peso a lo largo de todo el experimento, la evolución del peso del primer día del experimento.

5

Tabla 10:

	Dosis	Evolución del peso/incremento (g)					
		Día 1			Total		
		N	MW	STD	N	MW	STD
Forma I	(total)	15	-0,25	0,39	12	-1,85	0,54
	2 µg	5	-0,64	0,21	4	-2,41	0,37
	20 µg	5	-0,09	0,31	4	-1,46	0,28
	200 µg	5	-0,03	0,32	4	-1,69	0,47
Forma II	(total)	60	-0,62	1,56	48	-1,86	1,65
	2 µg	20	-0,57	1,86	18	-2,02	1,34
	20 µg	20	-0,55	1,56	16	-1,69	0,85
	200 µg	20	-0,72	1,28	14	-1,86	2,56
NaCl	-	20	-0,68	1,43	14	-1,77	1,89
Control	-	20	-0,50	2,16	11	-1,85	1,21
Total	-	115	-0,56	1,55	85	-1,84	1,51

10 Generalmente los ratones a los que se suministró la forma I de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica mostraron una menor pérdida de peso durante las primeras 24 horas tras la infección que los animales de los grupos de control. Esta ventaja se manifiesta claramente con las dosis de 20 y 200 µg de la forma I. Este indicio indirecto de una tasa de supervivencia generalmente superior en los grupos sometidos a las sustancias no pudo reconocerse en el caso de los animales, que sobrevivieron el segundo día.

15 **Ejemplo 5 - Probabilidad de supervivencia tras la infección con S. pyogenes**

En el modelo de septicemia descrito en el ejemplo 3 se comprobó la influencia de las formas cristalinas forma II y I de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica en la probabilidad de supervivencia de los ratones infectados con S. pyogenes. Cada uno de los grupos mostró diversas probabilidades de sobrevivir al menos 48 horas tras la infección. La proporción de los animales que sobrevivieron se muestra en la tabla 11.

20 Tabla 11:

	Dosis	N	Proporción de ratones supervivientes (%)
Forma I	(total)	15	80
	2 µg	5	80
	20 µg	5	80
	200 µg	5	80
Forma II	(total)	60	80
	2 µg	20	90
	20 µg	20	80
	200 µg	20	70
NaCl	-	20	70
Control	-	20	55
Total	-	115	74

Las formas I y II supusieron un aumento de la proporción de animales supervivientes en comparación con los ejemplares de control. Así pues cabe aceptar que tanto la forma I como la forma II son de influencia positiva sobre el estado séptico y ello, a saber, incluso con independencia de sus correspondientes efectos específicos.

#### Ejemplo 6 - concentración de gérmenes en la sangre y el hígado

- 5 En el modelo de septicemia descrito en el ejemplo 3 se comprobó la influencia de las formas cristalinas II y I de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica en la concentración de gérmenes en la sangre y el hígado de los ratones infectados con *S. pyogenes*. El experimento concluyó 48 horas tras la infección y se determinó la concentración de gérmenes (KBE) en la sangre y el hígado en este momento (tabla).

Tabla 12:

	Dosis	Concentración de gérmenes (KBE)					
		Sangre (log/mL)			Hígado (log/g)		
		N	MW	STD	N	MW	STD
Forma I	(total)	12	6,37	1,20	12	6,41	0,65
	2 µg	5	7,00	1,49	4	6,56	0,97
	20 µg	5	6,33	1,06	4	6,57	0,37
	200 µg	5	5,77	0,94	4	6,09	0,55
Forma II	(total)	46	5,80	1,37	47	6,36	1,52
	2 µg	16	5,96	1,21	17	6,13	1,69
	20 µg	16	5,88	1,65	16	6,79	0,76
	200 µg	14	5,54	1,26	14	6,14	1,91
NaCl	-	14	6,39	1,42	14	6,20	1,83
Control	-	2 10?	6,50	1,03	10	6,86	0,55
Total	-	82	6,07	1,33	83	6,40	1,40

10

Tanto la forma II así como forma I en su máxima dosificación mostraron una reducción tendencial de los gérmenes en la sangre en comparación con los ejemplares de control. Los inventores contemplaron esto mismo como un indicio de una mejor posibilidad de controlar la infección suministrando 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica, especialmente la forma 2. Cabe liminar lo dicho añadiendo que respecto de los animales muertos antes del final de experimento no se dispone de registro de número de gérmenes. Los inventores parten de la suposición según la cual en el caso de una constatación previa de la cantidad de gérmenes, la concentración de gérmenes de los animales que después murieron hubiera sido especialmente alta y, por tanto, en estos casos los efectos causados por las formas I y II hubieran sido todavía más notorios.

15

#### Ejemplo 7 - citoquinas en los animales sanos del experimento

- 20 En el suministro de las formas I y II a ratones sanos, en el marco del modelo de experimento con animales descrito en el ejemplo 3 se examinó si la aplicación influía en ciertas citoquinas de los ratones, especialmente IL-6 y alfa TNF, y cuál habría de ser esta influencia. La toma de sangre se realizó tras 48 horas, al final del segundo día de suministro. Respecto de IL-6 no pudieron constatar aumentos ni en los grupos sometidos a las substancias ni en los grupos de control. Los resultados relativos a alfa TNF se compilan en la tabla 13.

25

Tabla 13:

	Dosis	N	Alfa TNF (pg/mL)	
			MW	STD
Forma I	(total)	15	208,2	219,4
	2 µg	5	128,8	137,2
	20 µg	5	341,8	209,6
	200 µg	5	154,1	268,2
Forma II	(total)	30	5,65	30,93
	2 µg	10	0,0	0,0
	20 µg	10	0,0	0,0

	200 µg	10	16,94	53,58
NaCl	-	10	23,66	74,81
Control	-	10	0,0	0,0
Total	-	65	54,3	137,93

Mientras que la forma II y los controles no causan ningún aumento o ningún aumento relevante de alfa TNF, se dieron tras el suministro de la forma I unos aumentos considerables en comparación con el resto de los grupos. Este efecto fue más notorio con la dosificación de 20 µg; este grupo se diferencia significativamente ( $p < 0,001$ ) tanto de los grupos de control como de los grupos a los que se les suministró la forma II. A este respecto tiene lugar un efecto específico estimulante del sistema inmunológico con la forma I que no se observa con la forma II.

#### **Ejemplo 8 - citoquinas en el modelo de septicemia**

En el modelo de septicemia descrito en el ejemplo 3 se examinó también qué influencia tenía el suministro de la forma I y de la forma II sobre ciertas citoquinas, especialmente IL-6 y alfa TNF de animales infectados con *S. pyogenes*. La toma de sangre tuvo lugar hacia el final del experimento, 48 horas tras la infección.

Puesto que pudo mostrarse que aumento de las citoquinas causado por la infección se diferenciaba en parte significativamente también dentro de los grupos de control entre las repeticiones (control negativo y NaCl), no fue posible a este respecto la compilación de los datos procedentes de las repeticiones.

Se limita lo dicho mencionando además que también estos valores son sólo relativos a aquellos animales que sobrevivieron el segundo día del experimento hasta el final. Los inventores sospechan entonces que los animales muertos antes mostrarían unos valores de IL-6 muy negativos desde el punto de vista del pronóstico.

En todo caso se daban claras tendencias parciales de reducción de IL-6 por medio de la forma II, sin embargo lamentablemente esto no pudo confirmarse en todas las repeticiones. Actualmente los inventores están llevando a cabo demás experimentos con animales más apropiados para confirmar unívocamente también in vivo el efecto supresor de la forma II en las citoquinas.

#### **Ejemplo 9 – encinas hepáticas / transaminasas en animales experimentales sanos**

En el suministro de las formas I y II a ratones sanos se investigó la influencia de la aplicación en ciertas enzimas hepáticas, especialmente en las transaminasas GOT (AST) y GPT (ALT) y cuál es esta influencia. La toma de sangre se realizó al final del segundo día del experimento. A este respecto no pudieron constatarse considerables diferencias entre los grupos. Esto confirma la buena tolerancia mostrada en el ejemplo 3.

#### **Ejemplo 10- enzimas hepáticas / transaminasas en el modelo de septicemia**

En el modelo de septicemia descrito en el ejemplo 3 se examinó también qué influencia tenía el suministro de las formas I y II en ciertas enzimas hepáticas, especialmente en la transaminasa GOT (AST) y GPT (ALT) de los ratones infectados con *S. pyogenes*.

La toma de sangre se realizó 48 horas tras la infección. En el marco de una infección con cuadro clínico séptico pueden tener lugar parcialmente aumentos drásticos de los valores enzimáticos del hígado. En analogía a los valores de citoquinas en los ratones infectados también aquí se dieron diferencias significantes dentro de los mismos grupos entre las repeticiones, de modo que la evaluación total de los datos no fue posible. La forma II muestra en algunas repeticiones tendencias al descenso de los valores hepático-enzimáticos. Estos indicios no pudieron reconocerse, no obstante, en todas las repeticiones.

En general, no obstante, no pudieron constatarse diferencias considerables entre los grupos. En analogía a la cantidad de gérmenes del ejemplo 6 y los valores de citoquinas en el ejemplo 8 se cuenta con una *bias* para los datos que faltan de los animales que murieron prematuramente. Los inventores parten de la suposición de que una determinación de las transaminasas tras 24 horas demostraría una ventaja considerable para los ratones tratados con 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica, especialmente en su forma II.

#### Producción de las formas cristalinas de anhidratos I y II según la invención

En adelante se describe la producción de las formas cristalinas I y II de un modo ejemplar.

La síntesis relativa a todos los ejemplos de producción es en el actual estado de la técnica el conocido luminol, que puede producirse, por ejemplo, según el siguiente esquema de reacción:



En un segundo nivel se transpone 3-nitroftalhidracida en 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, de tal modo que 3-nitroftalhidracida (100g, 0.48 mol) 48.3 mmol) se disuelve en solución molar de 3 hidróxido de sodio (1700mL) calentando a aprox. 50-60°C. A esta solución se aplica en porciones el ditionito de sodio (300g, 1.73 mol).  
 5 Entonces aumenta la temperatura de la mezcla reactiva a unos 80°C aproximadamente. Tras el completo añadido de ditionito de sodio, la mezcla reactiva se calienta durante 4 horas con vista al reflujo. Se añade el ácido acético (200 mL, 1.73 mol) y la mezcla reactiva se refrigera durante la noche. El precipitado resultante se aísla y se depura con agua (3x 170mL). El producto se seca en el evaporador rotativo a unos 80°C/20 ± 10mbar aproximadamente.

10 Forma de anhidrato I

### 1. Ejemplo de producción I de la forma cristalina I

El objeto de la invención es un procedimiento para la producción de la forma de anhidrato I por medio de mezcla de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona (luminol) en disolución de sosa cáustica y la instilación de esta solución en alcohol líquido de bajo peso molecular, preferentemente etanol, que reduce el producto resultante de la  
 15 solubilidad de luminol-sal sódica resultante de tal modo, que el último empieza a precipitarse. Los alcoholes han de ser de un grado de pureza ≥ 95% preferentemente, mejor todavía ≥ 98%. El resultado obtenido por medio de la precipitación se seca según la invención a temperaturas entre 50 y máximamente 90°C.

### Ejemplo de producción I de la forma cristalina I, modo de ejecución I

En un modo de ejecución preferente del ejemplo de producción I es posible precipitar la forma cristalina I por medio de mixtura de 500-750 mL de una suspensión de luminol molar de 0,8 - 1,2 con una cantidad de 500-750 mL de una solución de bicarbonato sódico molar 1,0-1,3; a lo cual la mixtura a 20°C - 50°C se le añade por goteo agitando en 10-15 l de alcohol de bajo peso molecular, preferentemente etanol, de un grado de pureza ≥ 95%, mejor todavía ≥ 98%, y seguidamente la suspensión se agita de 15-25 horas a una temperatura de 10°C - 40°C.  
 20 El precipitado resultante se seca tras el aislamiento preferentemente al aire. Tras un posterior secado a una temperatura de 50°C - 80°C, el precipitado se disuelve en una cantidad de 10 a 20 veces de alcohol de bajo peso molecular, preferentemente etanol de un grado de pureza ≥ 95%, mejor todavía ≥ 98% y la suspensión se agita de 15 a 25 horas a 10°C-40°C y se filtra. La torta resultante de la filtración se seca seguidamente al aire, a una temperatura de 50°C - 90°C, preferentemente 50°C, se somete a un secado posterior, se pulveriza y se seca hasta alcanzar un contenido de agua de cristalización ≤ 0,4%, preferentemente ≤ 0,3% e idealmente ≤ 0,2%.

### Ejemplo de producción I de la forma cristalina I, modo de ejecución II

- a) En un modo de ejecución del ejemplo de producción I especialmente preferente, la forma cristalina I puede producirse de la siguiente manera:
- b) Colocar 190 - 220 g de luminol en un cuenco de cristal de 2 l agitando a una temperatura mínima de 20°C y diluir en una solución de 1,25 L 1,0-1,1 NaOH molar.
- 35 c) Aspirar la solución de la preparación por el filtro de succión de porcelana con filtro de papel de Ø 70 mm (por ejemplo Schleicher & Schuell del tipo 1575) sin demás enjuague.
- d) Colocar 12-14 l de etanol, preferentemente de un grado de pureza ≥ 98%, en el matraz redondo de tres bocas. Añadir goteando la solución de la preparación agitando a una temperatura de 20°C ± 10°C en un plazo de unos 25 min ± 10. Agitar la suspensión durante 16 ± 5 horas a 20°C ± 10°C.
- 40 e) Aspirar el precipitado a través de un filtro de succión de porcelana con filtro de papel y depurar (enjuagar) con aprox. 400 - 500 mL de un alcohol de bajo peso molecular, preferentemente etanol de un grado de pureza ≥ 98%.
- f) Repartir finamente la torta del filtrado en un cuenco de cristal y dejar que se seque bajo el tiro durante la noche. Seguidamente secar una vez más en la estufa (armario de secado) a 50°C-90°C, preferentemente 50°C-70°C, con especial preferencia a 50°C, hasta alcanzar la constancia de masa.
- 45 g) Pulverizar y pesar el precipitado.
- h) Colocar una cantidad de 12 a 15 veces (12-15mL/g) del precipitados obtenido (punto g) en un alcohol de bajo peso molecular (por ejemplo metanol, etanol, 2-propanol, preferentemente de un grado de pureza ≥ 98%) en un matraz de tres bocas de 4 l. Suspender en él el precipitado agitando. Dejar agitar la suspensión durante 16 h ± 5 h a 20°C ± 10°C. Aspirar la suspensión a través de un filtro de succión de porcelana con filtro de papel y depurar (enjuagar) con una cantidad aproximada de 500 mL de alcohol de bajo peso molecular.
- 50 i) Repartir la torta de filtrado finamente en un cuenco de cristal y dejar secar bajo el tiro durante la noche. Seguidamente secar en la estufa (armario de secado) durante 2 - 6 h a 50°C-70°C, preferentemente a 50°C, hasta alcanzar la constancia de masa. Pasar por el mortero y pesar la substancia. El contenido de agua de cristalización debe ser ≤ 0,4%, lo cual puede comprobarse, por ejemplo, por el método de titulación Karl- Fischer. Si el contenido de agua de cristalización es > 0,4%, repetir los pasos indicados de h) a i).
- 55

j) Pesar la sustancia y determinar el producto obtenido.

**Ejemplo de producción I de la forma cristalina I, modo de ejecución III**

La forma cristalina I puede producirse del modo más preferente posible como se indica en adelante.

- 5 a) Colocar 200 g de luminol en un cuenco de cristal de 2 l y disolver agitando a 30°C ± 10°C en 1,25 l de solución molar de NaOH.
- b) Aspirar la solución de la preparación a través de un filtro de succión de porcelana con un filtro de papel de Ø 70 mm (por ejemplo Schleicher & Schuell, tipo 1575); no depurar (enjuagar).
- 10 c) Colocar 12,5 l de etanol, preferentemente de un grado de pureza ≥ 99%, en un matraz redondo de tres bocas de 20 l. Añadir goteando la solución de la preparación agitando a 25°C ± 5°C durante 30 min ± 5 min. Dejar agitar la suspensión durante 20 h ± 1 h a 25°C ± 5°C.
- d) Aspirar la suspensión a través de un filtro de succión de porcelana con filtro de papel Ø 185 mm (por ejemplo Schleicher & Schuell, tipo 1575) y depurar (enjuagar) con aprox. 500 mL de etanol, preferentemente de un grado de pureza ≥ 99%. Repartir finamente la torta de filtrado en un cuenco de cristal y secar bajo el tiro. Seguidamente secar en la estufa (armario de secado) a 50°C-70°C, preferentemente a 50°C, hasta alcanzar la constancia de masa.
- 15 e) Pulverizar y pesar el precipitado.
- f) Colocar una cantidad de 12 veces (12 mL/g) del precipitados obtenido en etanol, preferentemente de un grado de pureza ≥ 99%, en un matraz de tres bocas. Suspender en él la sustancia agitando. Dejar agitar la suspensión durante 20 h ± 1 h a 25°C ± 5°C. Aspirar la suspensión a través de un filtro de succión de porcelana con filtro de papel Ø 185 mm (por ejemplo Schleicher & Schuell, tipo 1575) y depurar (enjuagar) con una cantidad aproximada de 500 mL de etanol de un grado de pureza ≥ 95%, preferentemente ≥ 98%. Repartir finamente torta de filtrado en un cuenco de cristal y secar bajo el tiro. Secar seguidamente en la estufa (armario de secado) a 50°C - 70°C, preferentemente a 50°C, hasta alcanzar la constancia de masa. Pasar el producto por el mortero y pesar.
- 20 g) El contenido de agua de cristalización debe ser ≤ 0,4%; puede determinarse, por ejemplo, por el método de titulación Karl-Fischer. Si el contenido de agua de cristalización es > 0,4%, repetir los pasos indicados de f) a g).
- 25 h) Pesar la sustancia y determinar el producto obtenido.

**Ejemplo de producción II de la forma cristalina I**

30 En condiciones acuosas y partiendo de luminol, puede producirse la forma cristalina I con una solución de hidróxido de sodio a la que se incorpora luminol. El luminol se disuelve agitando. Seguidamente se añade etanol durante 10-40 min de modo que el luminol se precipite a modo de sal. Tras el añadido completo y agitación durante varias horas se filtra la suspensión, se enjuaga la torta de filtrado y se seca.

**Ejemplo de producción II de la forma I, modo de ejecución II**

35 La forma cristalina I se produce en un modo preferente de ejecución empleando los siguientes equivalentes reactantes. Se produce una solución de equivalentes 1.0-1.4 de hidróxido de sodio en 4-7 vol/m de agua a la que se incorpora el equivalente 1 de luminol. La mezcla reactiva se agita hasta su disolución completa. Seguidamente se añade goteando etanol (50-70 vol/m) a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) durante unos 10-40 min aproximadamente. El luminol se precipita entonces en tanto sal sódica.

40 Tras el añadido completo la mezcla reactiva se agita durante varias horas a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) y la suspensión se filtra; la torta de filtrado se depura o enjuaga con etanol (aprox. 10-15 vol/m) y se seca discrecionalmente en una estufa de vacío (armario de secado) o en un evaporador rotativo.

**Ejemplo de producción II de la forma I, modo de ejecución III**

45 La forma cristalina I se produce en un modo de ejecución preferentemente empleándose los siguientes equivalentes de reactivos:

Substancia	Equivalente	Preparación	Cantidad [mol]
Luminol	1	82g	0.46
Hidróxido de sodio	1.2	22g	0.55
Agua para la solución de luminol	6 (vol/m)	490 mL	N/A
Etanol absoluto	60 (vol/m)	4.900 mL	N/A
Etanol absoluto para depurar	aprox. 13 (vol/m)	1.050 mL (3x350 mL)	N/A



Se produce una solución del equivalente 1.0 -1.4, hidróxido de sodio, preferentemente el equivalente 1.2 de hidróxido de sodio (22 g, 0,55 mol), en agua (6 vol/m) (10 l de reactor).

5 A la solución de hidróxido de sodio se le incorpora el equivalente 1, luminol. La mezcla reactiva se agita hasta su completa disolución. Se obtiene así una solución marrón clara.

Seguidamente a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante unos 20 min. Aproximadamente se añade goteando etanol (60 vol/m). El luminol se precipita entonces en tanto sal sódica.

10 Tras el añadido completo la mezcla reactiva se agita durante un máximo de 20 h, preferentemente 2-8 h, con especial preferencia 8 h, a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) y la suspensión se filtra; la torta de filtrado se purifica con etanol (aprox. 13 vol/m) y discrecionalmente se seca en la estufa al vacío (armario de secado) a  $50-90^{\circ}\text{C} / 1-3$  mbar, preferentemente a  $50-70^{\circ}\text{C}$ , con especial preferencia a  $50^{\circ}\text{C}$ , o en un evaporador rotativo a  $20 \pm 10$  mbar y a  $50^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$ , preferentemente a  $50^{\circ}-70^{\circ}\text{C}$ , con especial preferencia a  $50^{\circ}\text{C}$ .

**Ejemplo de producción III forma I, cantidades de preparación escalables**

15 Los inventores han encontrado que estas relaciones de equivalentes constatados son apropiadas para cualquier cantidad de preparación de luminol y que permiten la producción reducible de la forma deseada I.

**Forma de anhidrato II**

**Ejemplo de producción I de la forma cristalina II**

20 Los inventores ha descubierto un procedimiento para la producción de la forma cristalina II, en el que bajo condiciones acuosas se mezcla luminol con una solución de hidróxido de sodio y añadiendo 2-propanol el producto resultante de la solubilidad de la sal sódica luminol se reduce de tal modo que el último comienza a precipitarse. La sal sódica luminol precipitada se depura con 2-propanol y se seca hasta alcanzar la constancia de masa.

**Ejemplo de producción I de la forma cristalina II, modo de ejecución II**

25 En un modo de ejecución preferente la forma cristalina II se produce empleando los siguientes equivalentes de reactivos. Se crea una solución del equivalente hidróxido de sodio 1.0 - 2.0, preferiblemente de equivalente 1.1-1.4 de hidróxido de sodio, con especial preferencia del equivalente 1.2. de hidróxido de sodio, en 6-7.5 vol/m de agua, en la que se incorpora el equivalente 0.5-1 de luminol. La mezcla reactiva se agita hasta la disolución completa. Seguidamente se añade por goteo a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante unos 10-40 min aproximadamente 2-propanol (60-120 vol/m). Entonces el luminol se precipita en tanto sal sódica. Tras el  
30 añadido completo se agita la mezcla reactiva a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). El producto se filtra, se purifica con un alcohol de bajo peso molecular, preferentemente 2-propanol, (aprox. 13-16 vol/m) y discrecionalmente se seca en una estufa de vacío (armario de secado) a  $85^{\circ}\text{C}-120^{\circ}\text{C} / 1-3$  mbar, preferentemente a  $90^{\circ}\text{C} / 1-3$  mbar, o en el evaporador rotativo a  $85^{\circ}\text{C}-120^{\circ}\text{C} / 20 \pm 10$  mbar.

**Ejemplo de producción I de la forma cristalina II, modo de ejecución III**

35 En este modo de ejecución especialmente preferente se exponen los equivalentes y las cantidades de preparación para la producción de la forma cristalina II y son válidas para cualquier tamaño de preparación y se explica en adelante como ejemplo de tamaño de preparación de 10g de luminol.

Substancia	Equivalente	Preparación	Cantidad [mol]
Luminol	1	10g	56.5
Hidróxido de sodio	1,2	2.7g	67.5
Agua para la solución de luminol	6 (vol/m)	60 mL	N/A
2-propanol (absoluto)	60 (vol/m)	600 mL	N/A
2-propanol (absoluto) para depurar	15 (vol/m)	150 mL (3x50 mL)	N/A

40 Se disuelve el equivalente 1.2 de hidróxido de sodio y el equivalente 1 de luminol en agua (6 vol/m). Se forma una solución clara. Ésta debe reprocesarse inmediatamente, de lo contrario se oscurecería. Seguidamente a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante unos 20 min se añade 2-propanol (60 vol/m) y entonces se precipita el luminol en tanto sal sódica. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 1 - 5 h, preferentemente 2 h, con especial preferencia 3 h. El producto se filtra, se purifica con 2-propanol (aprox. 15 vol/m) y se seca  
45 discrecionalmente en la estufa de vacío (armario de secado) a  $85^{\circ}\text{C}-120^{\circ}\text{C} / 1-3$  mbar, preferentemente a  $90^{\circ}\text{C} / 1-3$  mbar o en el evaporador rotativo a  $85^{\circ}\text{C}-120^{\circ}\text{C} / 20 \pm 10$ mbar, preferentemente a  $90^{\circ}\text{C} / 20 \pm 10$  mbar hasta alcanzar la constancia de masa.

**Ejemplo de producción I de la forma cristalina II, modo de ejecución IV**

Los inventores muestran por lo demás un procedimiento apropiado para cantidades de preparación de luminol de mínimamente 300 g, preferentemente 400 g, con especial preferencia  $\geq 500$  g y se expone a modo de ejemplo para un tamaño de preparación de 785 g.

5

Substancia	Equivalente	Preparación	Cantidad [mol]
Luminol	1	785g	4.43
Hidróxido de sodio	1.2	212g	5.32
Agua para la solución de luminol	6 (vol/m)	4700 mL	N/A
2-propanol (absoluto)	60 (vol/m)	47000 mL	N/A
2-propanol (absoluto) para depurar	13 (vol/m)	10.5 l (3x3.5 l)	N/A

Se crea una solución de 212 g (5.32 mol, 1.2 equivalente) de hidróxido de sodio en 4.700 mL de agua. (80 l de reactor). El luminol (785 g, 4.43 mol) se incorpora a la solución de hidróxido de sodio y se agita hasta su disolución. Resulta una solución marrón clara a la que se bombea el 2-propanol (60 vol/m) a lo largo de un espacio de tiempo de 20 - 30 min, preferentemente 30 min. Entonces el luminol se precipita en tanto sal sódica. Tras el añadido completo la mezcla se agita durante mínimamente 10 h, preferentemente 12 h a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). La mezcla se filtra, la torta de filtrado se purifica con 2-propanol (13 vol/m) y discrecionalmente se seca en la estufa de vacío (armario de secado) a  $85^{\circ}\text{C}$ - $120^{\circ}\text{C}/1$ - $3$  mbar, preferentemente a  $90^{\circ}\text{C}/1$ - $3$  mbar o en el evaporador rotativo a  $85^{\circ}\text{C}$ - $120^{\circ}\text{C}/20 \pm 10$  mbar, preferentemente a  $90^{\circ}\text{C}/20 \pm 10$  mbar hasta alcanzar la constancia de masa.

**Ejemplo de producción I de la forma cristalina II, cantidades escalables de preparación**

Los inventores han constatado que la relación de equivalentes encontrada es apropiada para cualquier cantidad de preparación de luminol y permiten la producción reproducible de la forma II deseada. Al emplearse cantidades mayores de luminol ( $\geq 500$  g) y volúmenes [sic] ha de observarse que la duración de agitación debe prolongarse correspondientemente a fin de obtener un rendimiento de producto final tan alto como sea posible.

**Ejemplo de producción II de la forma cristalina II (recristalización)**

Los inventores han constatado que la forma cristalina II puede producirse por recristalización a partir de la forma cristalina I empleando los siguientes equivalentes.

En una solución de equivalente 1 de la forma I se incorpora 2-propanol (10 vol/m) de un grado de pureza de 70-90%, preferentemente de 80-90%, con especial preferencia de 90% y se agita 10-14 h, preferentemente 10-12 h a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). La mezcla se filtra y la torta de filtrado se depura con 2-propanol (aprox. 20 vol/m) y discrecionalmente se seca en la estufa de vacío (armario de secado) a  $85^{\circ}\text{C}$ - $120^{\circ}\text{C}/1$ - $3$  mbar, preferentemente a  $90^{\circ}\text{C}/1$ - $3$  mbar o en el evaporador rotativo a  $85^{\circ}\text{C}$ - $120^{\circ}\text{C}/20$  mbar  $\pm 10$  mbar hasta alcanzar la constancia de masa.

**Ejemplo de producción II de la forma cristalina II, recristalización de la forma I, cantidades de preparación escalables**

Un proceso de recristalización descubierto por los inventores puede emplearse con los siguientes equivalentes para cualquier cantidad de preparación, el cual se describe a modo de ejemplo para un tamaño de preparación de la forma I de 1 g.

Substancia	Equivalente	Preparación	Cantidad [mol]
Forma II	1	1g	5,02
Agua para la solución de 2-propanol	1 (vol/m)	1 mL	N/A
2-propanol	9 (vol/m)	9 mL	N/A
2-propanol para depurar	aprox. 20 (vol/m)	20 mL (2x10 mL)	N/A

La forma cristalina I (1 g) se suspende en 2-propanol acuoso (10-20% de agua) y se agita mínimamente durante 10 h, preferentemente durante 10-14 h, con especial preferencia durante 10-12 h a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$

± 5°C). Tras la filtración del agente disolvente restante la torta de filtrado se depura con 2-propanol (2x 10 mL) y se seca en el evaporador rotativo a 90°C/20 mbar hasta alcanzar la constancia de masa.

Índice de abreviaturas:

µg	Microgramo
aaO.	en el lugar indicado
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ca.	circa, aproximadamente
DMSG	Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft (Sociedad Alemana de Esclerosis Múltiple)
EMA	European Medicines Agency
g	Gramo
GOT	Glutamato-oxalacetato-transaminasa
GPT	Glutamato- piruvato-transaminasa
IL	Interleucina
KBE	Unidades formadoras de colonias
l	Litro
LPS	Lipopolisacárido
µg	Microgramo
mL	Mililitro
MW	Valor medio
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
REM	Microscopio electrónico de barrido
STD	Divergencia estándar
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades internacionales
vol/m	Unidad de volumen por unidad de masa
z.B.	por ejemplo

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Forma I o II de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica, caracterizada por los valores  
 cristalográficos registrados por medio de diagramas de rayos X de polvo:  
 valores d: 13,5; 6,9; 5,2; 4,6; 3,9; 3,5; 3,4; 3,3; 3,1; 3,0 y  
 valores 2-theta: 6,5; 12,7; 16,9; 19,3; 22,8; 25,8; 26,6; 27,2; 28,7; 30,3 relativos a la forma I  
 así como  
 valores d: 12,9; 7,9; 7,1; 6,5; 5,3; 4,0; 3,7; 3,6; 3,3; 3,2 y  
 10 valores 2-theta: 6,8; 11,2; 12,5; 13,7; 16,7; 22,4; 24,3; 24,9; 27,2; 27,8 relativos a la forma II,  
 por lo demás caracterizada por una temperatura de descomposición  $\geq 335^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ .
- 15 2. Forma cristalina I o II según la reivindicación 1, caracterizada por un contenido de agua de cristalización  $\leq 0,4\%$ .
- 20 3. Procedimiento para la producción de la forma cristalina I de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica  
 según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por la mezcla de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona con  
 disolución de sosa cáustica y añadido de etanol, a lo cual el producto resultante de la solubilidad de 5-amino-  
 2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica resultante se reduce de modo que el último se precipita, a lo cual el  
 producto cristalino precipitado se separa y se seca, la forma cristalina I se suspende varias veces en etanol,  
 se agita, se purifica con etanol y se seca una vez más.
- 25 4. Procedimiento para la producción forma cristalina I según la reivindicación 3, caracterizada por el hecho de  
 que el etanol de un grado de pureza  $\geq 98\%$ , con especial preferencia  $\geq 99\%$ , se añade a temperatura  
 ambiente durante 10-40 min, preferentemente durante 20 min.
- 30 5. Procedimiento para la producción de la forma cristalina I según la reivindicación 3 o 4 que abarca los  
 siguientes pasos o fases:
- a) Producción de una mezcla de 1.0-1.4 de equivalente de hidróxido de sodio, preferentemente 1.2 de  
 equivalente, con 4-7 de equivalente (vol/m) de agua, preferentemente 6 de equivalente (vol/m) de agua;
- b) Incorporación de 1 equivalente de luminol a esta mezcla y agitación hasta la disolución completa;
- 35 c) Añadido de 50-70 de equivalente, preferentemente de 60 de equivalente (vol/m) de etanol de un grado de  
 pureza  $\geq 98\%$ , con especial preferencia  $\geq 99\%$ , a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante 10-40 min,  
 preferentemente 20 min;
- d) Tras el añadido completo del etanol se vuelve a agitar la mezcla reactiva a temperatura ambiente durante  
 40 un tiempo máximo de 20 h, preferentemente 2-8 h, con especial preferencia 8 h, y se filtra la mezcla;
- e) Depuración o enjuagado de la torta de filtrado con 10-15 de equivalente (vol/m) de etanol,  
 45 preferentemente 13 de equivalente (vol/m) de etanol, de un grado de pureza  $\geq 98\%$ , con especial  
 preferencia  $\geq 99\%$ ;
- f) Secado del producto en la estufa de vacío (armario de secado) a  $50-90^{\circ}\text{C} / 1-3$  mbar preferentemente a  
 50  $70^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$ , con especial preferencia a  $80^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$  o en un evaporador rotativo a  $20 \pm 10$  mbar y  $50^{\circ}\text{C}-$   
 $90^{\circ}\text{C}$ , preferentemente a  $70^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$ , con especial preferencia a  $80^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$ , hasta alcanzar la constancia  
 de masa.
- 55 6. Procedimiento para la producción de la forma cristalina II de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal  
 sódica según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por la mezcla de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona  
 con disolución de sosa cáustica y añadido de 2-propanol, a lo cual el producto resultante de la solubilidad de  
 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona sal sódica se reduce de tal modo que el último se precipita y el  
 producto precipitado cristalino se separa y se seca.
7. Procedimiento para la producción de la forma cristalina II según la reivindicación 6, caracterizada por el  
 hecho de que el 2-propanol de un grado de pureza  $\geq 98\%$ , con especial preferencia  $\geq 99\%$ , se añade a  
 temperatura ambiente durante 10-40 min, preferentemente 20 min.
- 60 8. Procedimiento para la producción de la forma cristalina II según la reivindicación 6 o 7 que abarca los  
 siguientes pasos o fases:

## ES 2 487 221 T3

- a) Producción de una mezcla de 1.0-2.0 de equivalente de hidróxido de sodio, preferentemente 1.1-1.4 de equivalente, con especial preferencia 1.2 de equivalente, con 6-7.5 de equivalente (vol/m) de agua, preferentemente 6 equivalente (vol/m) de agua;
- 5 b) Añadido de 0.5-1 de equivalente de luminol y agitando la mezcla hasta la disolución completa;
- c) Añadido de 60 de equivalente (vol/m) de 2-propanol de un grado de pureza  $\geq 98\%$ , con especial preferencia  $\geq 99\%$ , durante  $20 \pm 10$  min, a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ );
- 10 d) Agitado de la suspensión a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ ) durante mínimamente 1 h;
- e) Filtrado y lavado de la torta de filtrados con 13-15 de equivalente (vol/m) de 2-propanol de un grado de pureza  $\geq 98\%$ , con especial preferencia  $\geq 99\%$ ;
- 15 f) Secado del producto en una estufa de vacío (armario de secado) a  $85^\circ\text{C}$ - $120^\circ\text{C}$  /1-3 mbar, preferentemente a  $90^\circ\text{C}$ - $100^\circ\text{C}$ , con especial preferencia a  $90^\circ\text{C}$  o en un evaporador rotativo a  $20 \pm 10$  mbar y  $85^\circ\text{C}$ - $120^\circ\text{C}$ , preferentemente a  $90^\circ\text{C}$ - $100^\circ\text{C}$ , con especial preferencia a  $90^\circ\text{C}$ , hasta alcanzar la constancia de masa.
- 20 9. Preparado farmacéutico, caracterizado por el hecho de contener la forma cristalina I y/o la forma cristalina II según la reivindicación 1 o 2.
10. Preparado farmacéutico según la reivindicación 9, caracterizado por la combinación con otras sustancias activas y/o adyuvantes.
- 25 11. Preparado farmacéutico según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por el hecho de que pueda contener sustancias farmacéuticas aceptables.
- 30 12. Forma cristalina I y/o forma cristalina II según la reivindicación 1 o 2 y/o preparado farmacéutico según al menos una de las reivindicaciones de 9 a 11 para el empleo en un proceso destinado a la modulación del sistema inmunológico.
- 35 13. Forma cristalina I y/o forma cristalina II según la reivindicación 1 o 2 y/o preparado farmacéutico según al menos una de las reivindicaciones de 9 a 11 para el empleo en un proceso destinado a la modulación del sistema inmunológico en combinación con terapias estándares.

Fig: 1

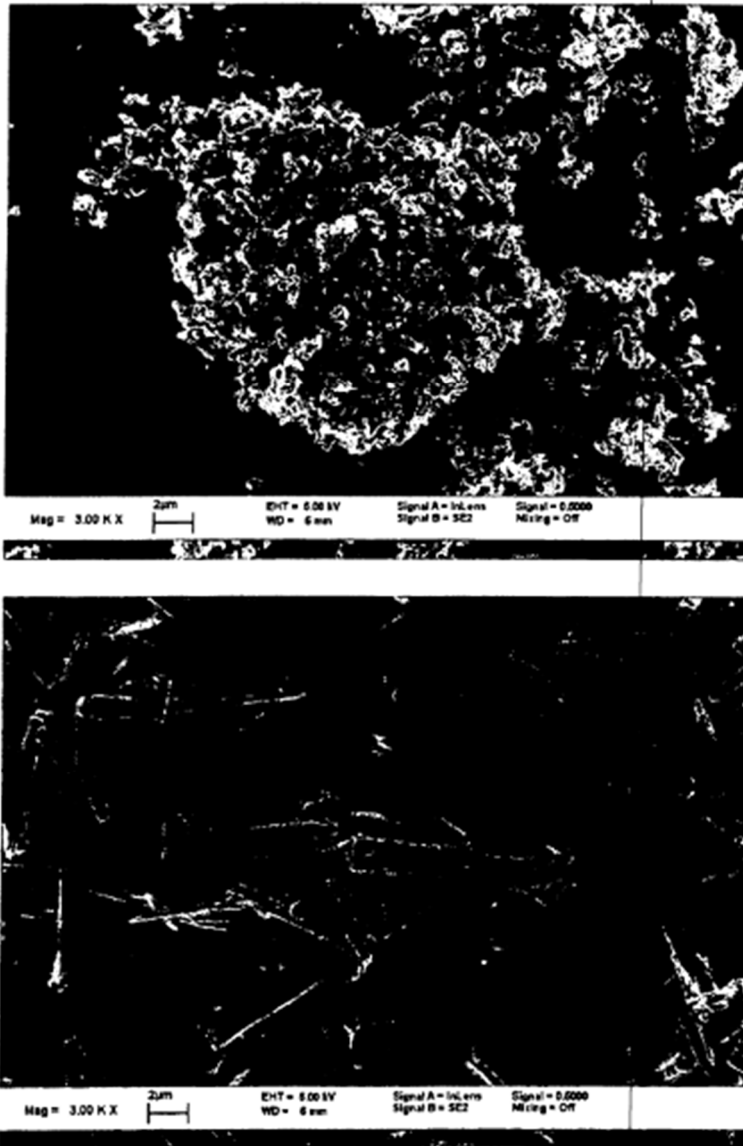


Fig. 2:

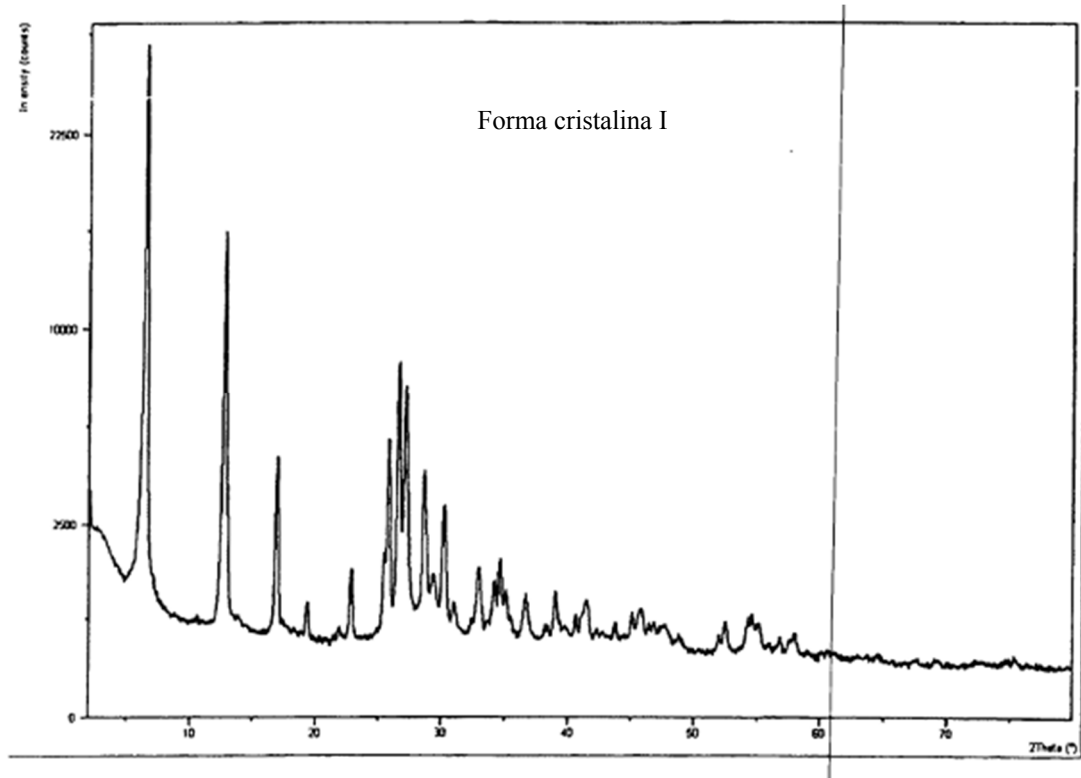


Fig. 3:

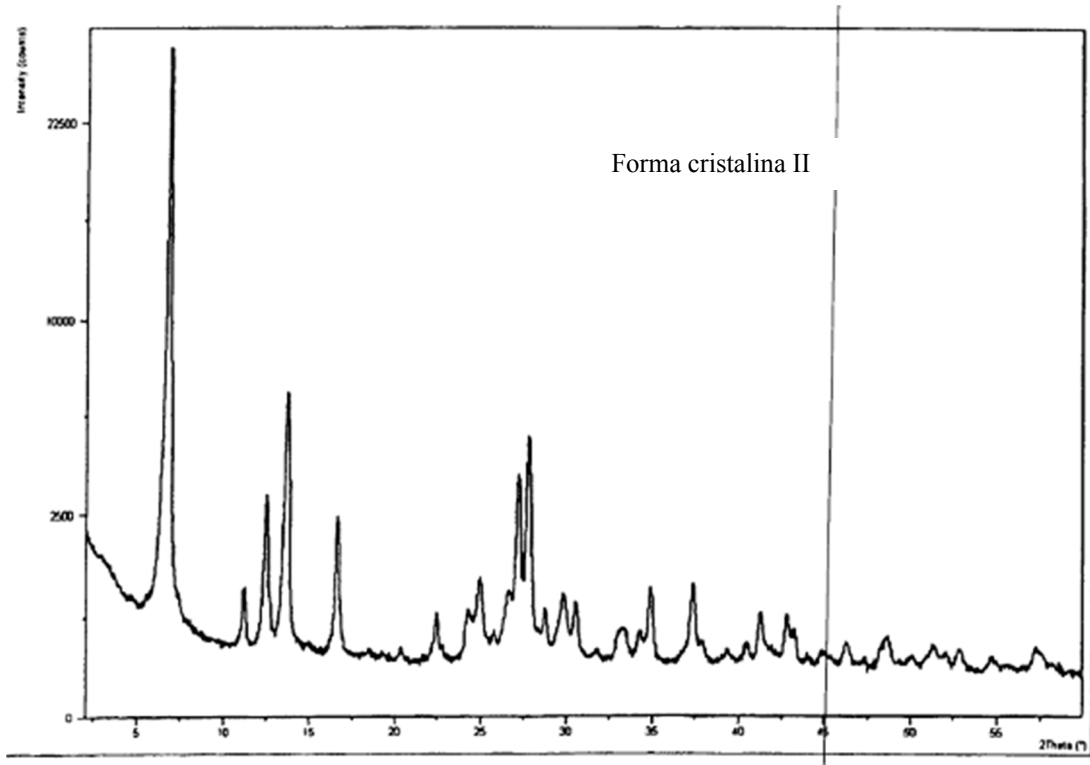


Fig. 4:

