

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 269**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12766329 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2681220**

54 Título: **Nueva forma cristalina de un inhibidor de la DPP-IV**

30 Prioridad:

03.03.2011 IN MM05902011

06.07.2011 IN MM19482011

30.09.2011 IN MM27772011

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

15.10.2015

73 Titular/es:

CADILA HEALTHCARE LIMITED (100.0%)
Zydus Tower Satellite Cross Roads
Ahmedabad 380 015, Gujarat, IN

72 Inventor/es:

PANDEY, BIPIN;
DAVE, MAYANK GHANSHYAMBHAI;
KOTHARI, HIMANSHU M. y
SHUKLA, BHAVIN SHRIPRASAD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 548 269 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

Nueva forma cristalina de un inhibidor de la DPP-IV

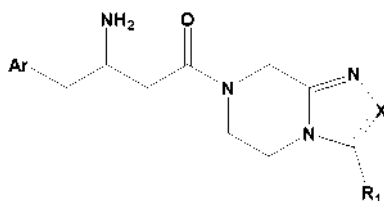
5 **Campo de la invención**

La presente invención desvela ciertas sales de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, así como sus procesos de preparación.

10 **Antecedentes de la técnica**

La invención se refiere a una nueva forma cristalina del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

- 15 El documento WO 03/004498 y la patente de EE.UU. N° 6.699.871, ambos asignados a Merck y Co., describen una clase de beta-amino tetrahidrotriazolo[4,3-a]pirazinas, que son inhibidores de la DPP-IV. En ellos se divulgan compuestos cuya fórmula general es



- 20 En el documento WO 03/004498 se divulga específicamente la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. El documento WO 03/004498 guarda silencio con respecto a la preparación y la naturaleza de las formas cristalinas específicas de las sales. El documento WO 2005/003135 describe la sal de dihidrogenofosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina e hidratos cristalinos de la misma, en particular un monohidrato cristalino.

- 25 En el documento WO 2005/003135 se dice que la sal de dihidrogenofosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y los hidratos cristalinos presentan ventajas en la preparación de composiciones farmacéuticas, tales como facilidad de procesado, de manipulación y de dosificación. En particular, mostraban una estabilidad física y química mejorada, tal como una estabilidad frente al estrés, altas temperaturas y humedad, así como unas propiedades fisicoquímicas mejoradas, tales como solubilidad y velocidad de disolución. El documento WO2005/020920 describe anhidratos cristalinos de la Forma I, la Forma II y la Forma III, así como solvatos de la sal de dihidrogenofosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

- 30 El documento WO2005/030127 describe un nuevo anhidrato cristalino de Forma IV de la sal de dihidrogenofosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

- 35 El documento WO2006/033848 describe la forma amorfa de la sal de dihidrogenofosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

- 40 El documento WO2005/072530 describe las sales cristalinas del ácido clorhídrico, del ácido bencensulfónico, del ácido p-toluensulfónico, del ácido 10-canforsulfónico y del ácido tartárico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina e hidratos de la misma.

- 45 El documento WO2007/035198 describe la sal de dodecilsulfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, en particular, una forma de anhidrato cristalino de la misma.

- 50 Además, la sal de hemifumarato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina ha sido descrita por D. Kim et al. en J. Med. Chem. 2005, 48, 141 - 151. Adicionalmente, la Publicación de Patente Internacional N° WO 2008/000418 desvela la preparación del clorhidrato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina en forma amorfa.

Además, la Publicación de Patente Internacional N° WO 2009/085990 describe otras sales de adición ácida de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina,

incluyendo sales del ácido di-p-tolil-L-tartárico, del ácido fosfórico, del ácido sulfúrico, del ácido bromhídrico, del ácido metanosulfónico, del ácido acético, del ácido benzoico, del ácido oxálico, del ácido succínico, del ácido mandélico, del ácido fumárico y del ácido láctico.

5 La Publicación de Patente N° WO 2010/00469 describe diferentes formas cristalinas de sales de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina tales como el clorhidrato, el succinato, el lactato, el maleato, el citrato y el mesilato.

10 La Publicación de Patente Internacional N° WO 2010/092090 describe otras sales de adición ácida de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, es decir, sales del ácido D-glucurónico, del ácido L-glucurónico, del ácido glutárico, del ácido láctico, del ácido L-mandélico, del ácido D-mandélico y del ácido sulfúrico.

15 La Publicación de Patente Internacional N° WO 2010/012781 describe otras sales de adición ácida de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, es decir, sales del ácido etanodisulfónico, del ácido galactárico, del ácido tiocínico y del ácido glutárico.

20 La Publicación de Patente Internacional N° WO 2010/117738 divulgaba diferentes formas cristalinas de acetato, de oxalato y de fumarato del compuesto de fórmula I. La Publicación de Patente Internacional N° WO 2012/007455 divulgaba la sal de orotato del compuesto de fórmula I.

25 Las diferentes sales y las nuevas formas cristalinas de la misma fracción farmacéuticamente activa difieren en sus propiedades físicas tales como el punto de fusión, la solubilidad, etc. Estas propiedades pueden afectar apreciablemente a las propiedades farmacéuticas tales como la velocidad de disolución y la biodisponibilidad, que a su vez pueden tener un impacto sobre su eficacia. Por lo tanto, existe una continua necesidad de obtener nuevas formas de sales de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina que tengan unas propiedades físicas y/o químicas mejoradas. La presente invención satisface esta necesidad.

30 En vista de lo anterior, sería deseable proporcionar nuevas formas cristalinas de la sal de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

35 En el presente documento divulgamos nuevas formas salinas cristalinas del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina que no han sido divulgadas en la técnica anterior.

40 Estas nuevas formas salinas cristalinas pueden mostrar unas ciertas propiedades farmacéuticas superiores en comparación con la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Breve descripción de los dibujos

45 La FIG. 1 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal cristalina del gentisato de la 2(R) 4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

La FIG. 2 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal amorfa del gentisato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

La Figura 3 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal cristalina del adipato de la 2(R) 4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

50 La FIG. 4 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal cristalina del clorhidrato de la 2(R) 4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

La FIG. 5 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de de la sal cristalina del besilato (I) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

55 La FIG. 6 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal cristalina del ácido trifluoroacético de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

La FIG. 7 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal cristalina del besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina de acuerdo con la presente invención.

60 La FIG. 8 es un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la sal amorfa del besilato de la 2(R) 4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

FIG. 9 - Efecto de la administración de una única dosis oral de los compuestos ZY a 10 mg/kg, PO sobre la OGTT en ratones C57 machos.

65 FIG. 10 - Efecto de la administración de una única dosis oral de los compuestos ZY a 10 mg/kg, PO sobre la OGTT en ratones C57 machos.

Objeto de la invención

La presente invención proporciona una nueva sal cristalina del besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, que puede ser caracterizada por su patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) y por otras propiedades características según se describe en lo sucesivo y en el proceso para la preparación de la misma.

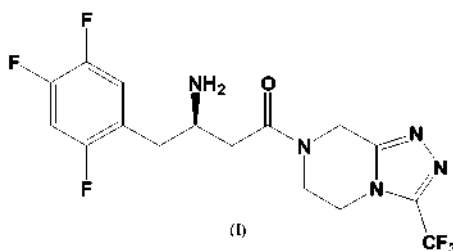
Descripción detallada de la invención

Según se usa en el presente documento, el término "temperatura de reflujo" se refiere al punto de ebullición del disolvente usado.

Según se usa en el presente documento, el término "PXRD" se refiere al patrón de difracción de rayos X en polvo.

Según se usa en el presente documento, el término "(2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina se refiere a la Sitagliptina.

Según se usa en el presente documento, el término "THF" se refiere a tetrahidrofurano, el término "DCM" se refiere a diclorometano, el término "DIPE" se refiere a di-isopropil éter, el término "MTBE" se refiere a metil t-butil éter, el término "IPA" se refiere a alcohol isopropílico, el término "IPAc" se refiere a acetato de isopropilo, el término "fosfato" se refiere a la sal de dihidrogenofosfato, el término "besilato" se refiere a la sal del ácido bencensulfónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, que tiene la fórmula estructural (I).



En una forma de realización se proporcionan la forma cristalina II del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo característico, con los picos expresados como 2θ a 5,69, 7,45, 10,08, 11,41, 13,09, 18,34, 22,52 y $22,97 \pm 0,2$ grados dos theta.

La (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina anhidra requerida para la preparación de la sal de besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, puede ser sintetizada mediante los procesos mencionados en el Ejemplo 18 y 19.

Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para la preparación de la forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina como anteriormente, que comprende

(a) la reacción de la base libre (fórmula I) en las condiciones de reacción adecuadas con el ácido bencensulfónico en un disolvente adecuado elegido de entre una mezcla de ésteres y agua, una mezcla de ésteres, éteres y agua, una mezcla de ésteres, alcoholes y agua, una mezcla de éster, hidrocarburos y agua, una mezcla de ésteres, cetonas y agua;

(b) la eliminación adecuada del disolvente para obtener la forma cristalina II del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Los alcoholes adecuados usados se eligen de entre metanol, etanol, isopropanol, butanol, 1,2-dimetoxi etanol, 2-metoxi etanol, 2-etoxi etanol, etilenglicol, hexanol, heptanol, octanol, decanol y similares; los ésteres usados se eligen de entre acetato de etilo, acetato de isopropilo y similares; los disolventes clorados usados se eligen de entre cloroformo, diclorometano y similares; los hidrocarburos usados se eligen de entre hexano, heptanos, ciclohexano, tolueno, xileno, colobenceno y similares; las cetonas usadas se eligen de entre acetona y similares; los éteres usados se eligen de entre éter dietílico, 1,4-dioxano, DIPE, MTBE, THF y similares.

La forma cristalina II está adicionalmente caracterizada por unos picos adicionales de XPRD a aproximadamente 16,63, 20,82, 21,95, 23,75, 24,49, 25,02, 26,43, 27,66 y $30,19 \pm 0,2^\circ$ grados 2θ . La Fig. 7 ilustra la XRD de la forma cristalina II de sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

La (2R)-4-oxo-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,3]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina anhídrica requerida para la preparación de la forma amorfa de la sal de (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina puede ser sintetizada mediante los procesos mencionados en los ejemplos 18 y 19.

Todas las clases de disolventes anteriores, conocidas por la persona experta en la materia, están contempladas sin limitación. El disolvente orgánico aceptable para la práctica del proceso descrito en el presente documento proporciona preferiblemente una solubilidad suficiente para la sustancia activa y no provoca ninguna reacción química indeseable con la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina ni con la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, tal como una degradación o una reacción secundaria, en las condiciones de procesado.

La etapa de recuperación b) puede implicar la eliminación del disolvente mediante una destilación o mediante una filtración.

Generalmente se prefiere la utilización de un secado rápido para proporcionar la forma amorfa de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina con las características deseadas de estabilidad, contenido en humedad y disolvente residual. El producto resultante puede secarse mediante el uso de cualquiera de los métodos de secado, incluyendo un secado por pulverización, una evaporación rotatoria (tal como mediante el uso de un Rotavapor Buchi), un secado en película fina agitada, un secado rotatorio instantáneo, un secado en lecho fluido, liofilización, u otras técnicas conocidas en la materia.

El proceso también puede incluir el secado adicional del producto obtenido a partir de la solución mediante un secado a vacío sobre un desecante, tal como pentóxido de fósforo (P₂O₅). El producto también puede obtenerse con otros agentes de secado adecuados tales como carbonato de potasio (K₂CO₃), carbonato de sodio (Na₂CO₃), gel de sílice y similares, como apreciará un experto en la materia.

La Fig. 8 ilustra la XRD de una forma amorfa de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Métodos analíticos:

El espectro completo en polvo de rayos X, que se registró con un difractómetro en polvo de rayos X modelo Rigaku multiflex de 2,0 kilovatios mediante el uso de radiación de cobre. El patrón de difracción por rayos X se registró manteniendo los parámetros del instrumento indicados a continuación:

i) Rayos X: Cu / 40 kv / 30 mA, ranura de divergencia: 1°, ranura de dispersión: 1°, ranura de recepción: 0,15 mm, monocromador RS: 0,8 mm, contador: contadores de centelleo; modo de barrido: continuo, velocidad de barrido: 4,000 grados/min, ancho de muestreo: 0,010°, ejes de barrido: 2 theta frente a CPS, intervalo de barrido: desde 4° hasta 40,0°, compensación de Theta: 0,000.

ii) El análisis por calorimetría diferencial de barrido se realizó con un modelo DSC-60 de Shimadzu (S/W: TA-60WS Aquisición versión 2.1.0.0) manteniendo los siguientes parámetros: tamaño de la muestra: aprox. 1 - 2 mg, bandejas de muestra: bandejas herméticas / onduladas, temperatura inicial: 50 °C, temperatura final: 300 °C, velocidad de calentamiento: 10 °C/min, gas de purga: nitrógeno, caudal: 20 ml/min

iii) El espectro de infrarrojos (IR) se ha registrado con un espectrómetro modelo Shimadzu FTIR-8400, entre 450 cm⁻¹ y 4.000 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹ en un sedimento de KBr.

iv) Se analizó la pureza de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y de sus sales mediante una HPLC analítica a una λ_{máx} de 210 nm mediante el uso de una columna YMC-C8, de 250 mm x 4,6 mm x 4 mm o su equivalente de AGILENT 1100 series en las siguientes condiciones: detector: fotómetro de absorción UV, longitud de onda: 210 nm, temperatura de la columna 25 °C, caudal: 1,0 ml/min, volumen de inyección: 10 µl, fase móvil: KH₂PO₄ 10 mM (a pH - 6,8):acetonitrilo (55:45)

Se analizó la pureza quiral de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y de sus sales mediante una HPLC a una λ_{máx} de 268 nm mediante el uso de una columna Chiral-Cel OJ-H, de 250 mm x 4,6 mm x 5 µm o su equivalente del modelo Shimadzu LCVP en las siguientes condiciones: detector: fotómetro de absorción UV, longitud de onda: 268 nm temperatura de la columna: 35 °C caudal: 0,8 ml/min, volumen de inyección: 10 µl, fase móvil: 0,1 % de dietil amina en [n-Hexano:Etanol (90:10)]

v) Los puntos de fusión se recogieron con un aparato de punto de fusión VEEGO make modelo VMP-D y están sin corregir.

La forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-

7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina también puede ser útil como un agente terapéutico para el tratamiento de ciertos trastornos.

La forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina preparada de acuerdo con la presente invención presenta una estabilidad química y polimórfica durante su almacenamiento a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 60\% \pm 5\%$ de HR durante 3 meses. Los resultados de la estabilidad de la forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Estudio de estabilidad durante el almacenamiento ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 60\% \pm 5\%$ de HR)

Sal	Ensayo		Inicial	Después de 3 meses
besilato cristalino (II)	Descripción		Polvo de color blanco	Polvo de color blanquecino
	Pureza (mediante HPLC)		99,87 %	99,97 %
	Agua (mediante KFR)		2,77 %	2,90 %
	Polimorfismo	XRD	Patrón cristalino	Sin cambios

Debe apreciarse que el documento WO03004498 no proporciona ningún dato sobre la actividad biológica de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. La forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina de la presente invención deriva de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina, y por lo tanto estamos proporcionando la comparación entre la forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina con la forma cristalina monohidratada de la sal de fosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Estudio comparativo de eficacia de (i) el gentisato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (ii) la forma cristalina de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (iii) la sal amorfa del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y frente a la forma cristalina monohidratada de la sal de fosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SB):

Datos sobre el material de ensayo:

- (i) gentisato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SG).
- (ii) sal cristalina del besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SB_{II}).
- (iii) sal amorfa del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SB_a).
- (iv) forma cristalina monohidratada de la sal de fosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SP).
- (v) (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SB):

Protocolo de estudio:

Se usaron los ratones C57BLKS/J machos de entre ocho y de semanas de edad obtenidos en Animal Research Facility del Zydus Research Centre. A los ratones se les permitió acceso *ad libitum* a comida y agua. Los animales estaban en un ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad. El protocolo de uso de los animales para la realización de este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética Animal (IAEC).

En estos animales se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). Los ratones fueron privados de alimentos durante 18 h y después se administró fármaco o vehículos con una carga de glucosa (3 g/kg) por vía oral. Se recogieron muestras sanguíneas (200 μ l) a los 0, 30, 60, 120 y 240 min. Se determinaron las concentraciones séricas de glucosa mediante el uso de los kits disponibles comercialmente adquiridos en RFCL (New Delhi, India) mediante el uso de un ensayo espectrofotométrico. Después se analizaron los valores de glucosa mediante el uso de GraphPad Prism versión 5.04 para Windows; programa informático GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos. Se calculó el área bajo la curva durante 120 min, sobre cuya base se obtuvo el porcentaje de inhibición para cada tratamiento.

Resultados:

Grupo	% de cambio en el AUC de la glucosa
control con vehículo	-
(SB _{II}) (10 mg/kg)	-45,7 ± 1,5
(SB) (10 mg/kg)	-36,5 ± 1,6
(SG) (10 mg/kg)	-39,4 ± 1,8
(SBa) (10 mg/kg)	-43,3 ± 1,6
(SP) (10 mg/kg)	-31,9 ± 1,8

Los resultados indican que la sal cristalina del besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SB_{II}) y la sal amorfa del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SBa) son mejores que la forma cristalina monohidratada de la sal de fosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SP) cuando se ensayan en la prueba de tolerancia aguda a la glucosa oral en ratones C57.

Por lo tanto, la presente forma cristalina II de la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina tiene potencialmente unas ventajas terapéuticas significativas en comparación con la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SB) a partir de la cual deriva, y también mejor que la forma cristalina monohidratada comercializada de la sal de fosfato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (SP).

La invención esta adicionalmente ejemplificada por los siguientes ejemplos no limitantes, que son ilustrativos y representan los modos preferidos de llevar a cabo la invención. El ámbito de la invención no está limitado únicamente a estas formas de realización específicas, sino que está definido por las reivindicaciones.

Ejemplo de referencia 1**Preparación de la sal del ácido adípico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina**

En un matraz de tres bocas de 25 ml se recogieron etanol (10,0 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (2,0 g). Se calentaron a 68 - 70 °C y se añadió ácido adípico (0,717 g). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 78 - 80 °C. Gradualmente se enfrió hasta 25 - 30 °C y se agitó de nuevo durante entre 2 y 3 h. La sal sólida precipitó. La sal se filtró y se lavó con etanol que proporcionó se obtuvo la sal del ácido adípico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (Peso: 1,54 g, % de rendimiento: 56,8 %. Pureza mediante HPLC: 99,29 %. % de pureza quiral mediante una HPLC del isómero R: 100,0 %). p. f.: 138 - 142 °C. XRD: cristalina, Fig. (3).

Ejemplo de referencia 2**Preparación de la sal del ácido gentísico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina y de su forma amorfa.**

En un matraz de fondo redondo de 25 ml se recogieron agua (10 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (2,0 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 98 - 100 °C para obtener una disolución clara. A esta disolución clara se añadió ácido gentísico (0,756 g) y se agitó a 98 - 100 °C durante de entre 1 y 2 h. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener una masa sólida (peso: 2,7 g).

El sólido se recogió en DIPE (20 ml) y se agitó durante 1 h y después el disolvente se decantó. Después el sólido se disolvió en IPA. El disolvente se eliminó por destilación para obtener la sal del ácido gentísico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina en forma de un sólido amorfo. (Peso: 1,91 g, % de pureza: 93,47 %. % de agua: 3,99 % p/p. XRD = amorfa, Fig. (2).

Ejemplo de referencia 3**Preparación de una forma amorfa de la sal del ácido gentísico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina**

En un matraz de fondo redondo seco de 50 ml se recogieron metanol (20 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-

dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (4.0 g). A esta disolución clara se añadió ácido genticónico (1,51 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 65 - 67 °C y se agitó durante 2 h. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener una masa sólida. (Peso: 5,5 g).

% de agua: 0,82. XRD = amorfa Fig. (2). % Pureza, 99,34 %. TGA, 4,4 %. DSC, 87,3 y 213,2.

5

Ejemplo de referencia 4

Preparación de una forma amorfa de la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina

10

La sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina se formó mediante la mezcla de ácido genticónico (0,189 g) y de (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,500 g) en metanol (2,5 ml), seguido de una agitación a la temperatura de reflujo durante 2 h. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la sal de genticato sólida (peso: 0,680 g)

15

La sal (0,600 g) se disolvió en IPA (1,2 ml). A la solución se añadió DIPE (2,4 ml). Se agitó durante 1 h a 25 - 30 °C, el sólido precipitó y después el disolvente se decantó. El disolvente residual se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina en forma de un sólido amorfo. (Peso: 0,260 g, % de pureza: 99 %, % de agua: 1,99 % p/p, XRD = amorfa, Fig. (2)).

20

Ejemplo de referencia 5

Preparación de una forma amorfa de la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina

25

La sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina se formó mediante la mezcla de ácido genticónico (0,113 g), (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,300 g) en una mezcla de alcohol isopropílico (0,6 ml) y cloroformo (1,5 ml), seguido de una agitación a la temperatura de reflujo durante 2 h. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la sal sólida de genticato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina en forma de un sólido amorfo. [Peso: 0,410 g, % de pureza: 98,9 %, XRD = amorfa, Fig. (2)].

30

35

Ejemplo de referencia 6

Preparación de una forma amorfa de la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina

40

La sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina se formó mediante la mezcla de ácido genticónico (0,113 g), (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,300 g) en una mezcla de alcohol isopropílico (0,6 ml) y acetonitrilo (1,5 ml), seguido de una agitación a la temperatura de reflujo durante 2 h. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la sal sólida de genticato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina en forma de un sólido amorfo. [Peso: 0,410 g, % de pureza: 98,9 %, XRD = amorfa, Fig. (2)].

45

Ejemplo de referencia 7

50

Preparación de la forma cristalina de la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina

En un matraz de fondo redondo seco de 25 ml se recogieron metanol (10 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (2,0 g). A esta disolución clara se añadió ácido genticónico (0,756 g) La mezcla de reacción se calentó hasta 65 - 67 °C y se agitó durante 2 h. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la sal del ácido genticónico. Posteriormente se añadió la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (450 mg) disuelta en etanol (4,5 ml) y tolueno (4,5 ml), se agitó durante entre 2 y 3 h. La sal sólida precipitó, se filtró y se lavó con tolueno. Posteriormente, el sólido se secó para obtener la sal del ácido genticónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. (Peso: 257 mg, XRD: cristalina, Fig. (1))

55

60

Ejemplo de referencia 8**Preparación de la sal de clorhidrato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.**

5 En un matraz de tres cuellos seco de 50 ml se recogieron metanol (2,5 ml), IPA (21,3 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (2,0 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 40 - 45 °C para obtener una solución clara. A esta solución clara se añadió IPA-HCl hasta pH ácido y después se añadió éter dietílico (2,5 ml) a la mezcla de reacción. Se agitó durante 1 h a 25 - 30 °C.

10 La sal sólida precipitó. Después se calentó hasta 55 °C y después se enfrió hasta 25 - 30 °C. La sal sólida se filtró y se lavó con IPA. Se obtuvo la sal de clorhidrato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (Peso 1,1 g, % de pureza mediante HPLC: 99,98 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %, p. f. = 168 - 170 °C, XRD = cristalina (Fig. 4).

Ejemplo de referencia 9**Preparación de sal de besilato (I) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.**

20 En un matraz de fondo redondo seco de 50 ml se recogieron acetato de isopropilo (25 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,5 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 45 - 50 °C y se añadió una solución de ácido bencensulfónico (0,194 g) en IPAc (2,3 ml). Una vez completada la adición, la sal sólida precipitó. Después se enfrió hasta 25 - 30 °C. La sal se filtró y se lavó con hexano. Se obtuvo la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (Peso 0,63 g, % de pureza mediante HPLC: 99,76 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %), p. f. = 171 - 174 °C, XRD = cristalina (Fig. 5).

Ejemplo 10**Preparación de la sal hidratada de besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.**

30 En un matraz de fondo redondo seco de 50 ml se recogieron acetato de isopropilo (250 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (5,0 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 45 - 50 °C y se añadió lentamente una solución de ácido bencensulfónico (1,93 g) en una mezcla de agua (0,5 ml) y acetato de isopropilo (23 ml). Se agitó durante 2 h a 50 °C. Después se enfrió hasta 25 - 30 °C. La sal se filtró y se lavó con IPA y hexano. Se obtuvo la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. Se secó. (Peso 6,7 g, % de agua, 2,96 %, % de pureza mediante HPLC: > 99,0 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %), p. f. = 172 - 174 °C, XRD = cristalina (Fig. 7).

Ejemplo 11**Preparación de la sal hidratada de besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.**

45 En un matraz de fondo redondo seco de 50 ml se recogieron cloroformo (5 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,5 g) y agua (0,5 ml). La mezcla se agitó a 25 - 30 °C durante 5 - 10 min y se añadió ácido bencensulfónico sólido (0,193 g). Se calentó a la temperatura de reflujo y se agitó durante 2 h. Después se enfrió hasta 25 - 30 °C y se agitó durante 68 h a 25 - 30 °C. La sal se filtró y se lavó con cloroformo. Se obtuvo la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. Se secó. (Peso 0,660 g, % de agua, 1,93 %, % de pureza mediante HPLC: > 99,0 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %).

Ejemplo 12**Preparación de la sal hidratada de besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.**

60 Al matraz de fondo redondo de 25 ml se añadieron acetato de isopropilo (5 ml), tetrahidrofurano (0,25 ml), agua (0,5 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,5 g). La mezcla se agitó a 25 - 30 °C durante 5 - 10 min y se añadió ácido bencensulfónico sólido (0,194 g). Se calentó a la temperatura de reflujo y se agitó durante 2 h. Después se enfrió hasta 25 - 30 °C y se agitó durante 15 - 30 min a 25 - 30 °C. La sal se filtró y se lavó con acetato de isopropilo. Se obtuvo la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. Se secó. (Peso 0,680 g, % de agua, 2,2 %, % de pureza mediante HPLC: > 99,0 %, % de pureza quiral mediante HPLC: >

99 %).

Ejemplo 13

5 Preparación de la sal hidratada de besilato (II) de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Al matraz de fondo redondo de 25 ml se añadieron acetato de isopropilo (5 ml), tolueno (0,25 ml), agua (0,5 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (0,5 g). La mezcla se agitó a 25 - 30 °C durante 5 - 10 min y se añadió ácido bencensulfónico sólido (0,194 g). Se calentó a la temperatura de reflujo y se agitó durante 2 h. Después se enfrió hasta 25 - 30 °C y se agitó durante 15-30 min a 25 - 30 °C. La sal se filtró y se lavó con acetato de isopropilo. Se obtuvo la sal de besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina. Se secó. (Peso 0,660 g, % de agua, 1,61 %, % de pureza mediante HPLC: > 99,0 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %).

Ejemplo de referencia 14

20 Preparación de la sal del ácido trifluoroacético de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

En un matraz de fondo redondo seco de 25 ml se recogieron isopropanol (15 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (1,0 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 78 - 80 °C y se añadió ácido trifluoroacético (0,28 g). Se agitó durante 1,5 h a 80 - 82 °C. Después se enfrió hasta 25 - 30 °C. Entonces el disolvente se evaporó. La sal se disolvió en IPA y se precipitó con DIPE. La sal del ácido trifluoroacético de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina se filtró y se lavó con DIPE. Se secó. (Peso 0,89 g, % de pureza mediante HPLC: > 98 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %), XRD = cristalina (Fig. 6).

Ejemplo de referencia 15

30 Preparación de la sal del ácido trifluoroacético de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

La sal del ácido trifluoroacético de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (6,5 g) se agitó con acetato de isopropilo (90 ml) durante 2 h a 25 - 30 °C. La sal se filtró y se lavó con acetato de isopropilo. Se secó (peso 5,4 g, % de pureza mediante HPLC: > 98 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %, % agua, 3,14 %). XRD = cristalina (Fig. 6).

Ejemplo de referencia 16

45 Preparación de la sal amorfa del ácido bencensulfónico de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

En un matraz de fondo redondo seco de 25 ml se recogieron metanol (2 ml) y (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (1,0 g). Después se añadió ácido bencensulfónico (0,38 g). Se agitó durante 3 h a 28 °C. Además, se añadió diclorometano (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 28 °C. Entonces el disolvente se eliminó por destilación a 25 - 30 °C a presión reducida. Se obtuvo la sal amorfa del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (peso 1,2 g, % de pureza mediante HPLC: > 98 %, % de pureza quiral mediante HPLC: > 99 %), XRD = amorfa (Fig. 8).

Ejemplo de referencia 17

55 Preparación de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina a partir de la sal de fosfato monohidratada de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Se recogieron la sal de fosfato monohidratada de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (2 g) y agua (10 ml) en un matraz de tres cuellos de 50 ml. A la solución se añadieron cloruro de sodio (3,4 g), bicarbonato de sodio (0,33 g) en pequeñas porciones y acetato de etilo (20 ml) a 25 - 30 °C. Se agitó durante 15 - 30 min a 40 - 42 °C. Se transfirió a un embudo de separación; se recogió la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (20 ml); se recogió la capa orgánica. Todas las capas orgánicas se combinaron. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-

2-amina (peso 1,8 g, % de agua, 1,18 %, % de pureza mediante HPLC: > 99,0 %).

Ejemplo de referencia 18

- 5 **Preparación de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina a partir de la sal de fosfato monohidratada de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.**

10 Se recogieron la sal de fosfato monohidratada de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (2 g) y agua (10 ml) en un matraz de tres cuellos de 50 ml. A la solución se añadieron cloruro de sodio (3,4 g), hidróxido de sodio acuoso al 10 % (3 ml) y acetato de etilo (20 ml) a 25 - 30 °C. Se agitó durante 15 - 30 min a 25 - 30 °C. Se transfirió a un embudo de separación; se recogió la capa orgánica. La capa acuosa se saturó con cloruro de sodio (3,4 g) y se extrajo dos veces con acetato de etilo (20 ml).
15 Todas las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (peso 1,6 g, % de agua, 0,39 %, % de pureza mediante HPLC: > 99,0 %).

Ejemplo de referencia 19

- 20 **Preparación de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina**

25 La (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (21,0 g, pureza quiral, 96,4 %, preparada según el método divulgado en la patente WO 2010/032264) se disolvió en alcohol isopropílico (42,0 ml) a 68 - 70 °C. Después se enfrió hasta 45 - 48 °C y se añadió gota a gota n-heptano (168 ml) durante un periodo de 30 - 45 min. El sólido precipitó. Se enfrió hasta 25 - 30 °C y se agitó durante 1 h. El sólido se filtró y se lavó con una mezcla de alcohol isopropílico y n-heptano [63 ml (1:4)]. Se secó a presión reducida para obtener la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina (17,1 g, pureza, 99,5 %, pureza quiral, 99,5 %, % de agua, 0,16 %).
30

REIVINDICACIONES

- 5 1. La forma cristalina II del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo característico con unos picos expresados como 2θ a 5,69, 7,45, 10,08, 11,41, 13,09, 18,34, 22,52 y $22,97 \pm 0,2$ grados dos theta.
- 10 2. Un proceso para la preparación de la forma cristalina II del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende
- 15 (a) la reacción de la base libre (fórmula I) en unas condiciones de reacción adecuadas con ácido bencensulfónico en un disolvente adecuado elegido de entre una mezcla de ésteres y agua, una mezcla de ésteres, éteres y agua, una mezcla de ésteres, alcoholes y agua, una mezcla de éster, hidrocarburos y agua, una mezcla de ésteres, cetonas y agua;
- (b) la eliminación adecuada del disolvente para obtener la forma cristalina II del besilato de la (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amina.

Fig. 1

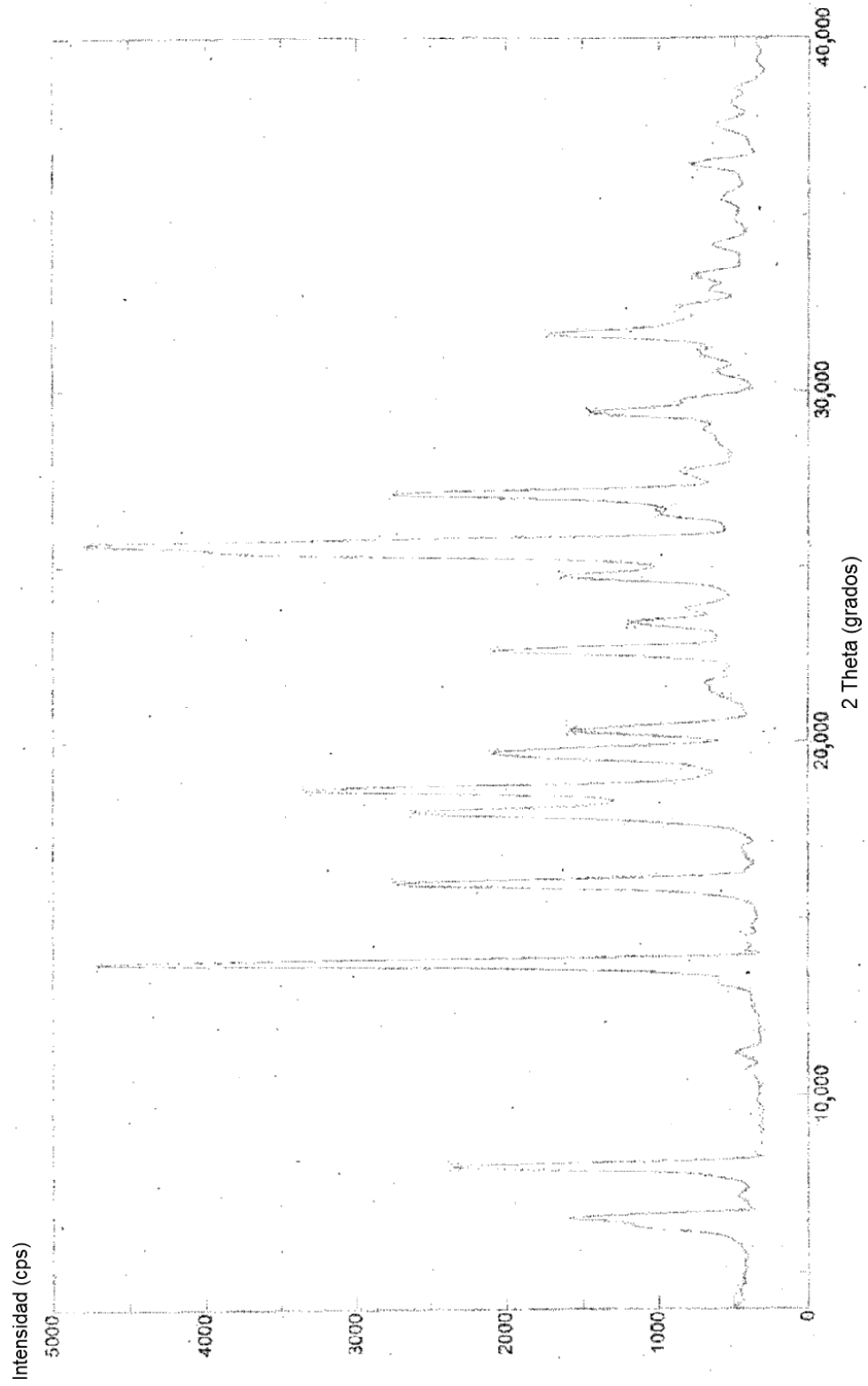


Fig.2

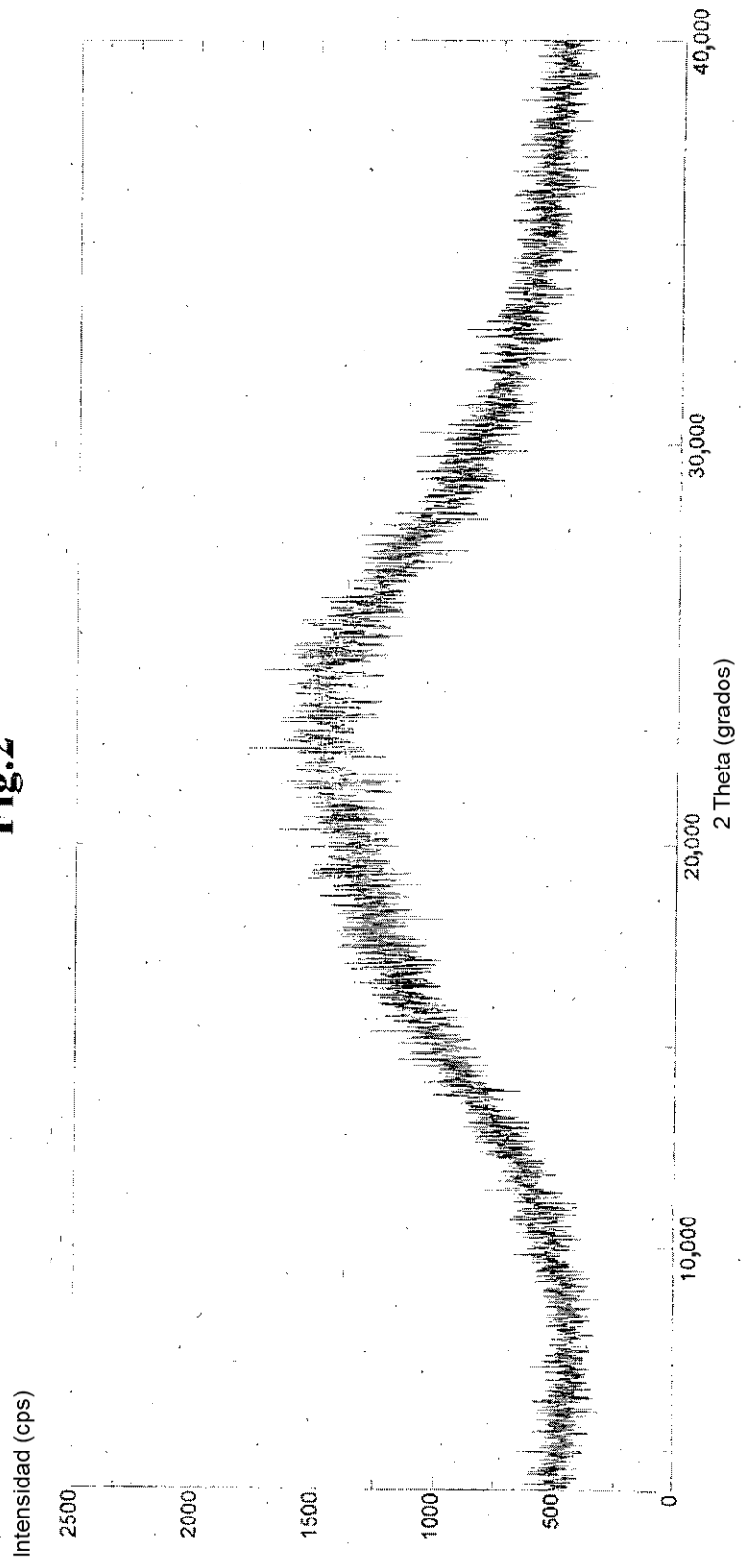


Fig. 3

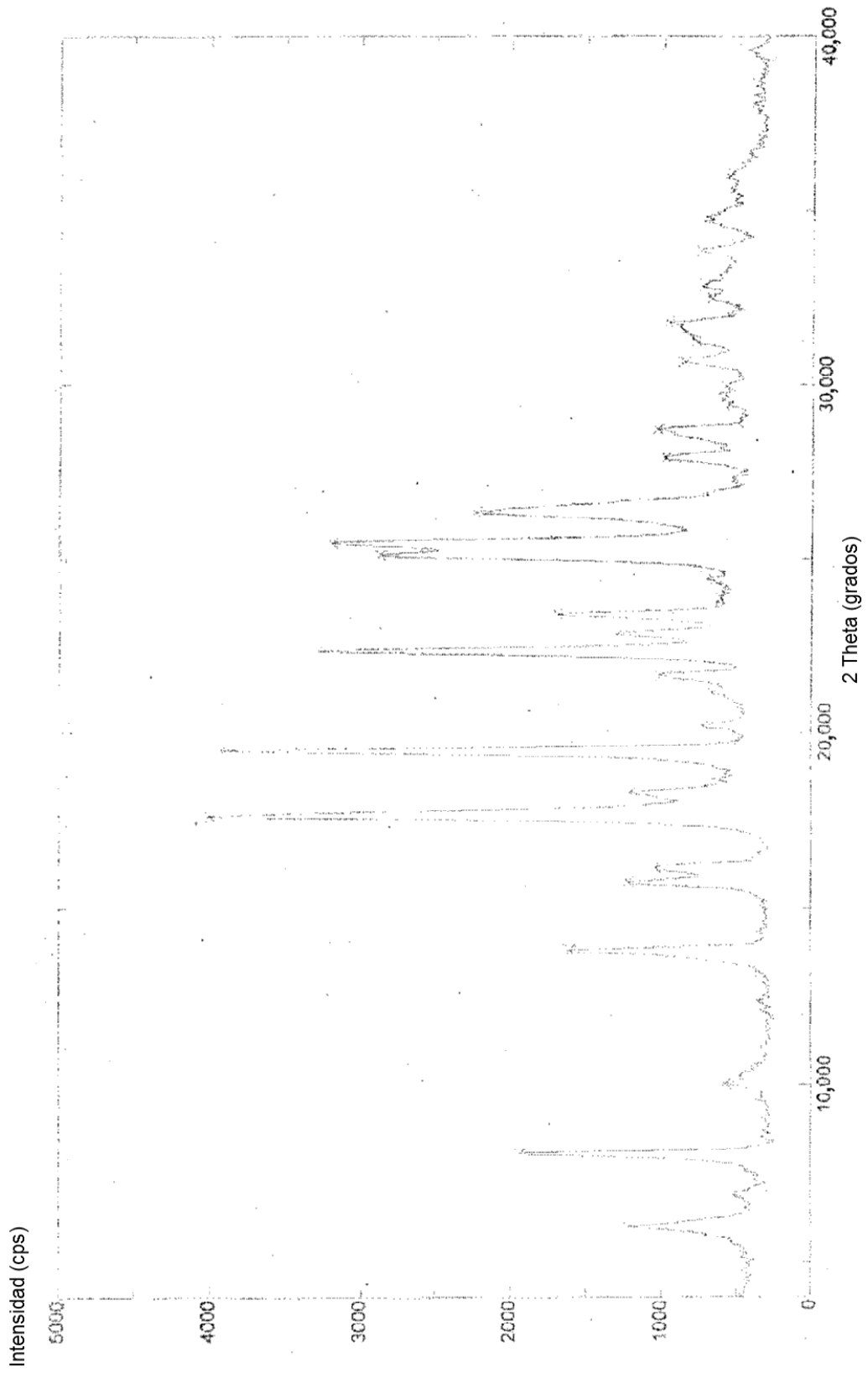


Fig-4

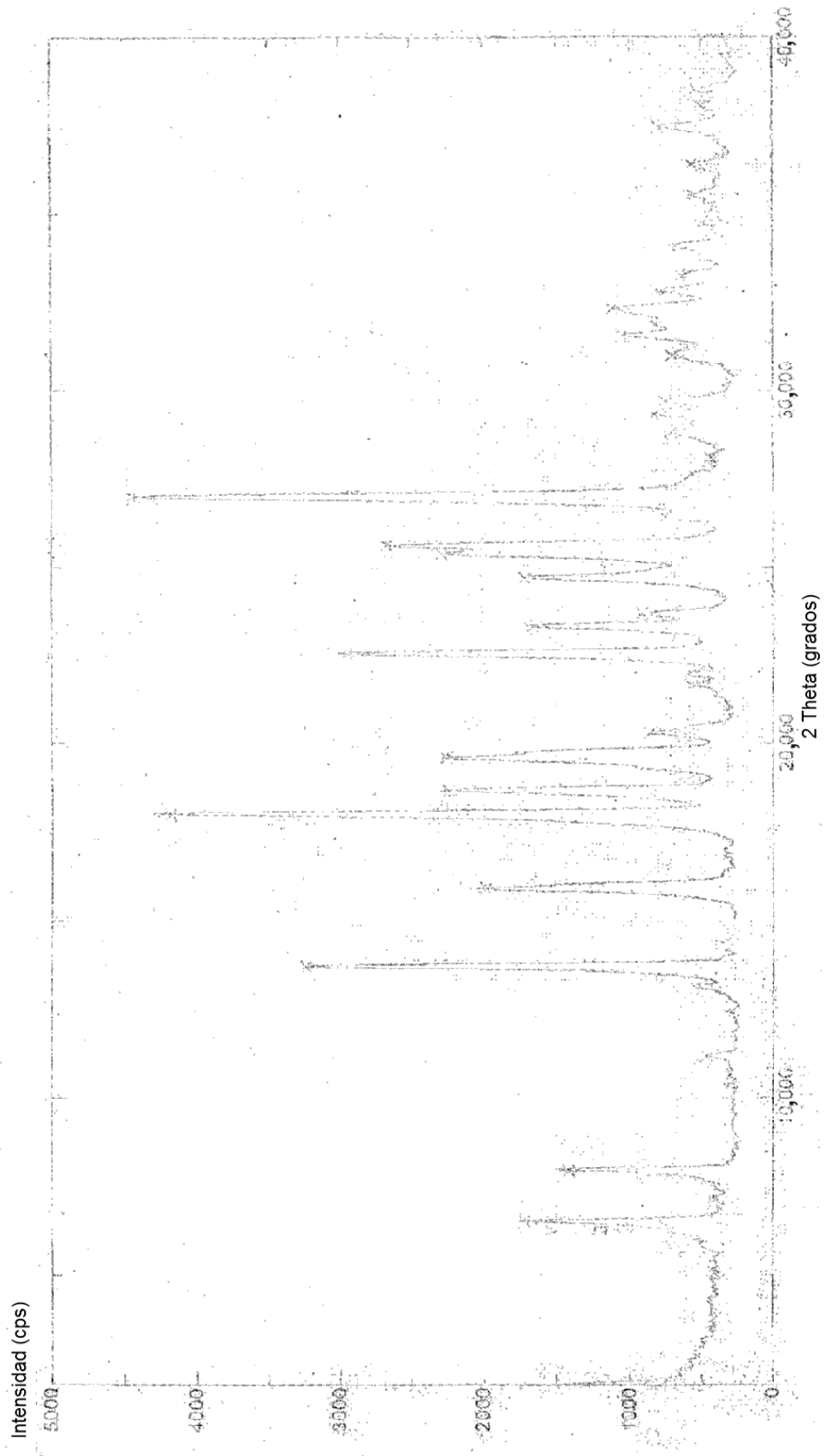


Fig-5

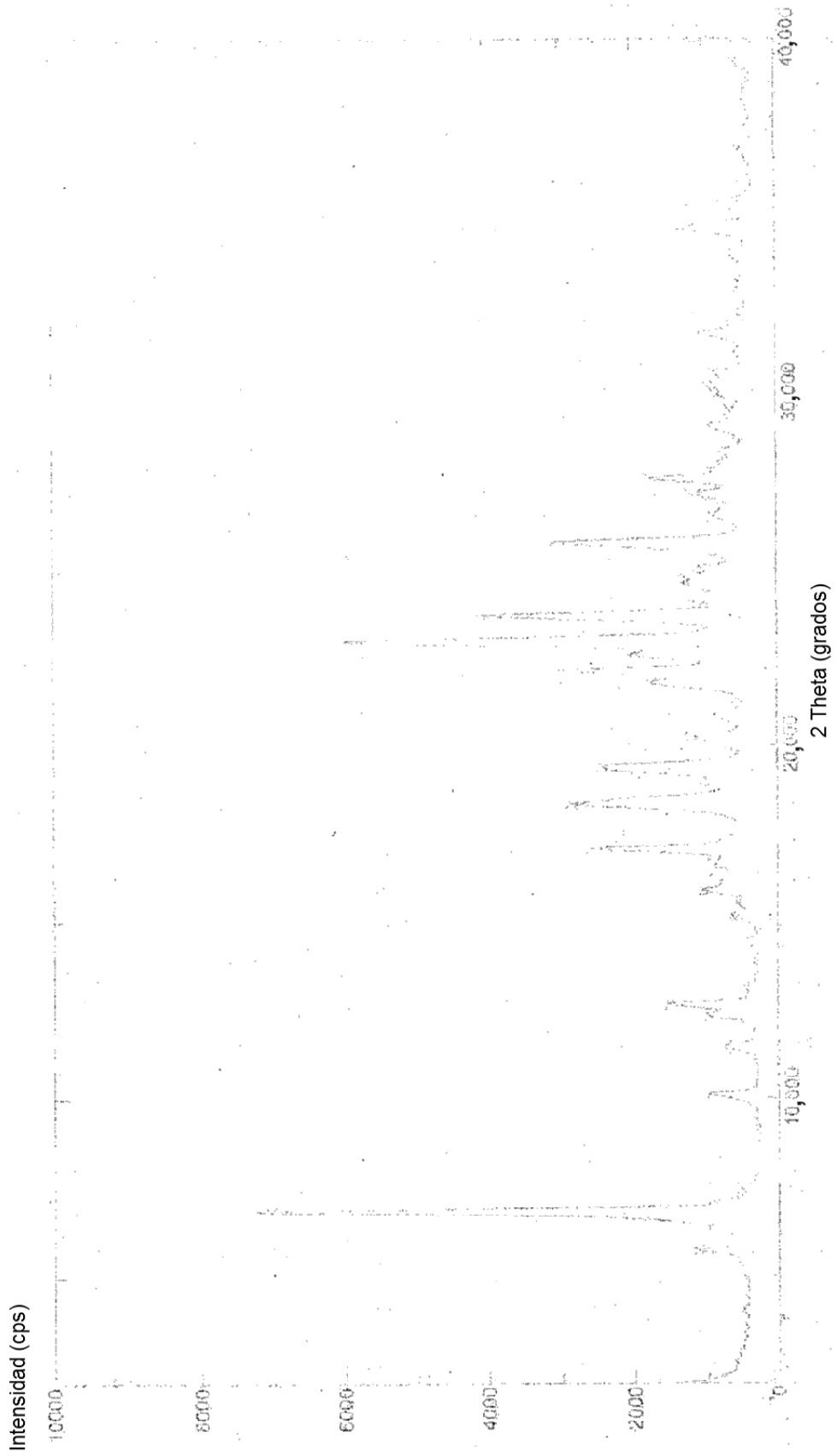


Fig-6

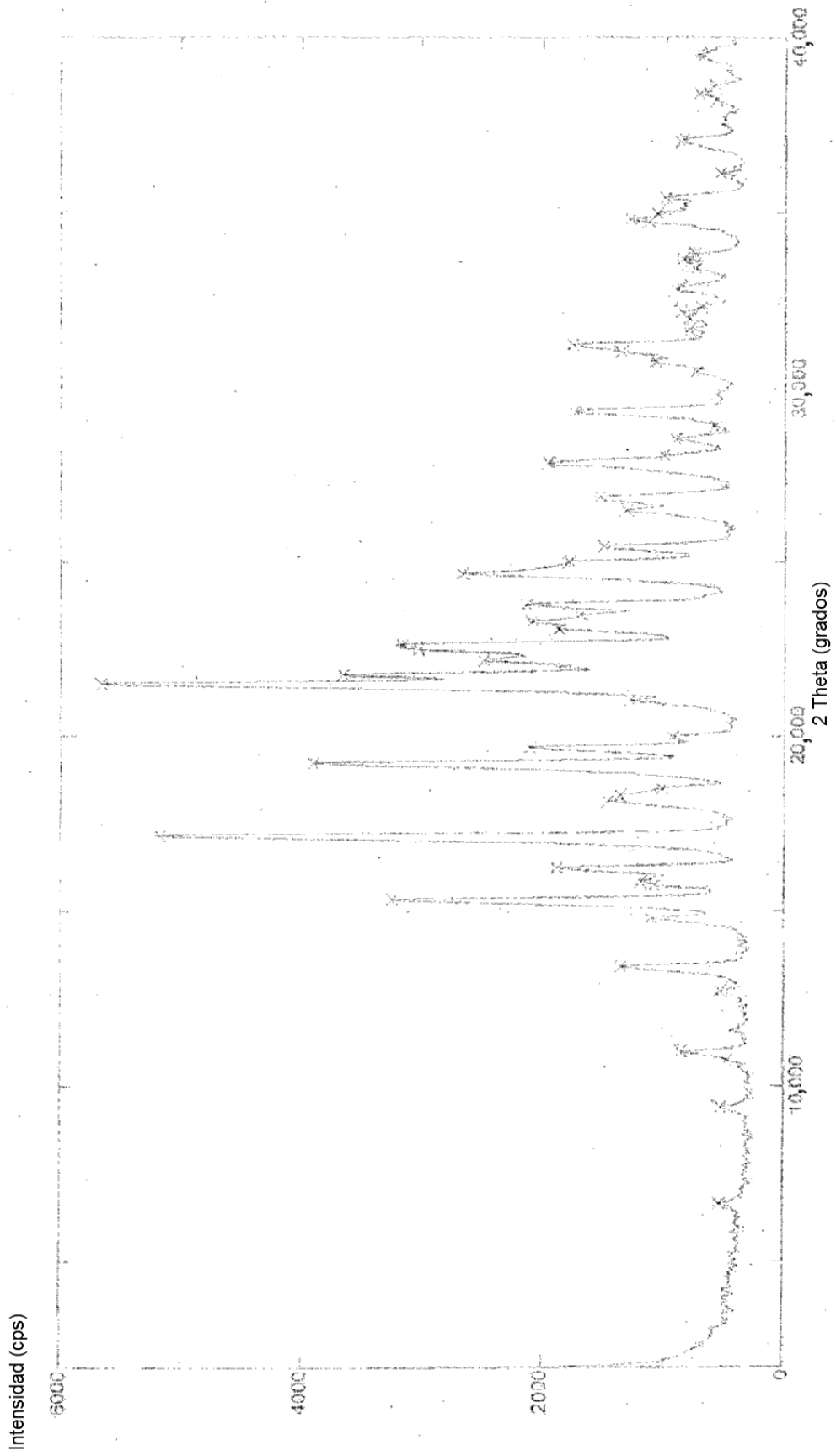


Fig-7

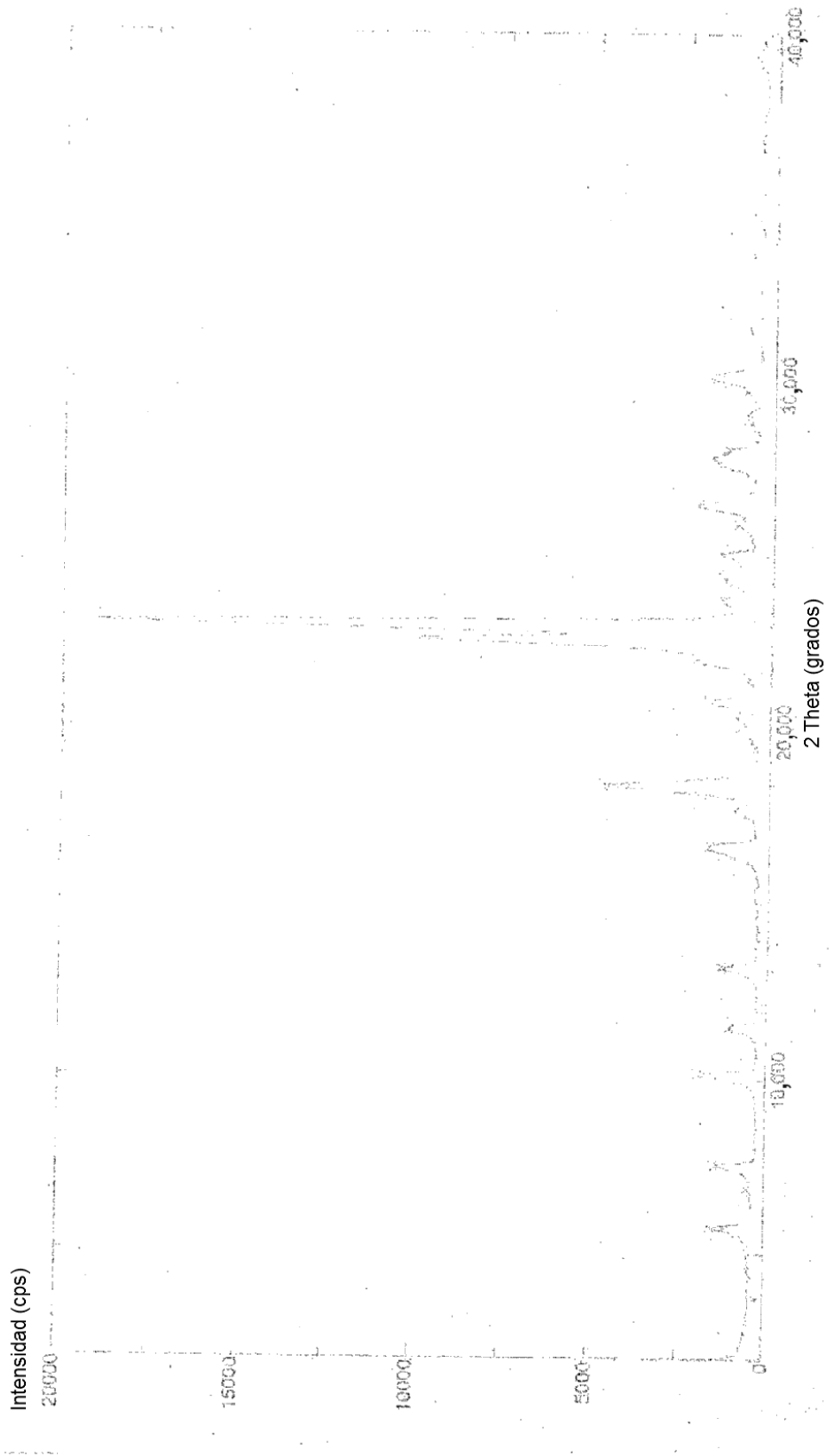


Fig-8

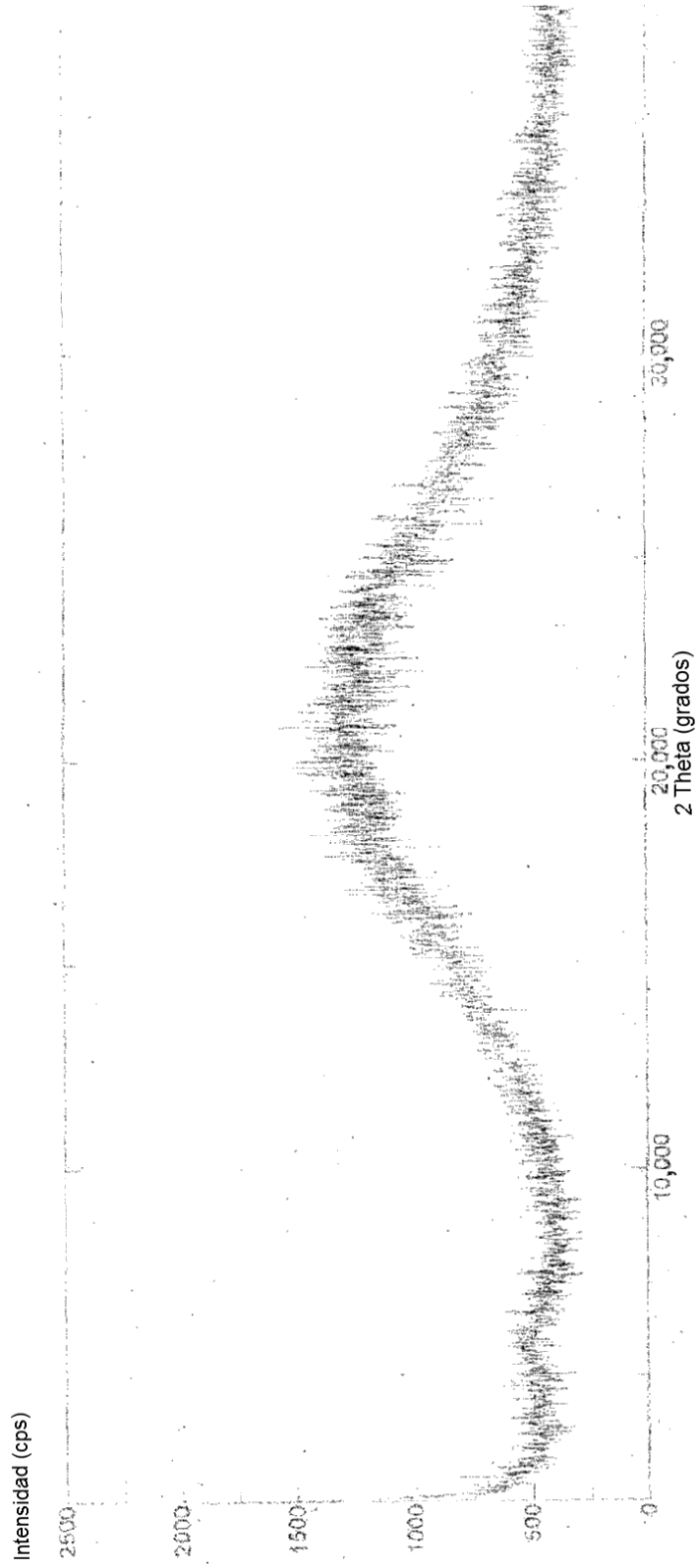


Figura: 9 -Efecto de la administración de una única dosis oral de los compuestos ZY a 10 mg/kg, PO sobre la OGTT en ratones C57 machos.

Efecto de la administración de una única dosis oral de los compuestos ZY a 10 mg/kg, PO sobre la OGTT en ratones C57 machos.

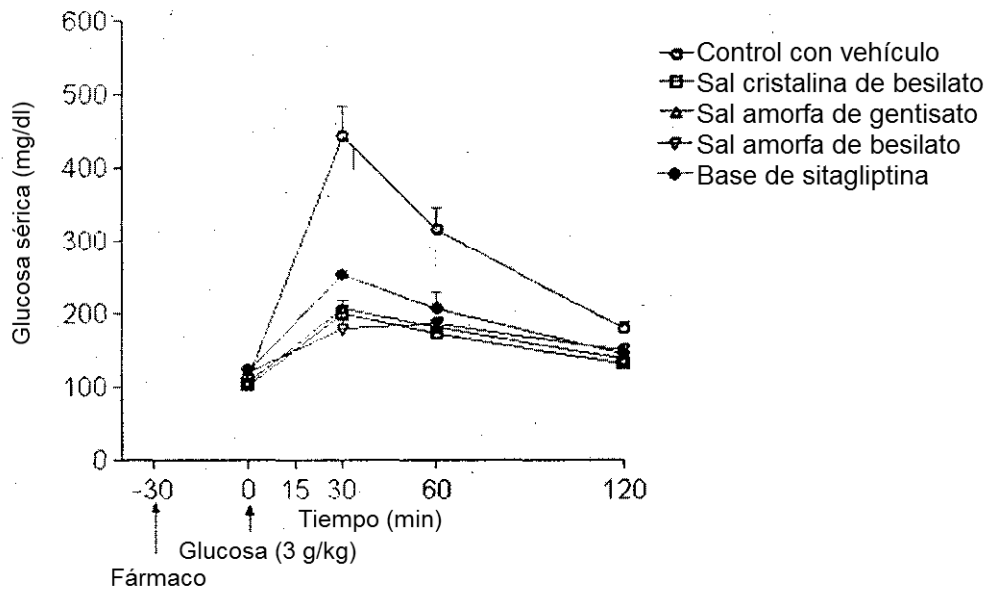
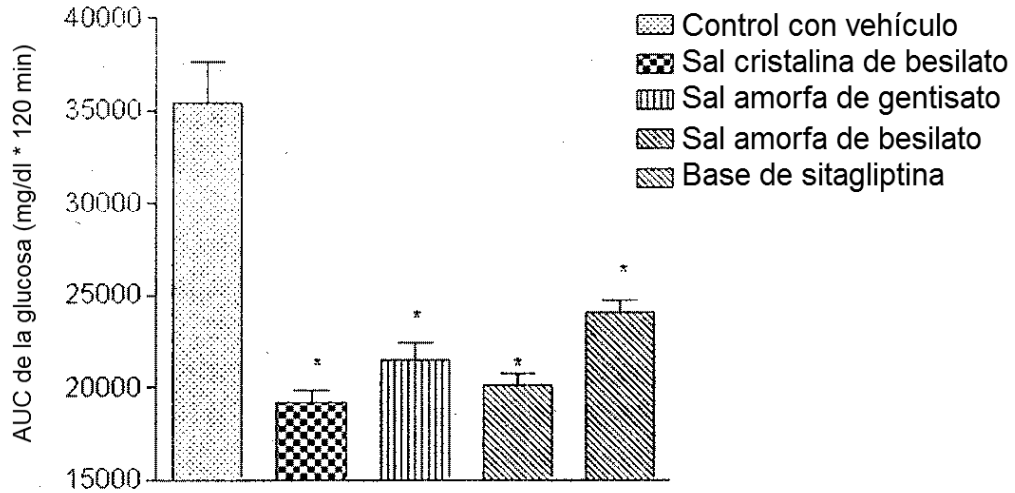


Figura: 10 -Efecto de la administración de una única dosis oral de los compuestos ZY a 10 mg/kg, PO sobre la OGTT en ratones C57 machos.

Efecto de la administración de una única dosis oral de los compuestos ZY a 10 mg/kg, PO sobre la OGTT en ratones C57 machos.



Media \pm EEM (n = 6) * P < 0,001 frente al control con vehículo
 Datos analizados mediante un ANOVA monofactorial seguido por una prueba de Dunnett