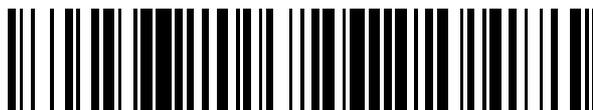


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 135**

51 Int. Cl.:

**C07D 217/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2011** **E 11740973 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2595960**

54 Título: **Sal y solvatos de un derivado de tetrahydroisoquinolina**

30 Prioridad:

**21.07.2010 US 366367 P**

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

**17.05.2016**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MCCARTHY, THOMAS DAVID;  
KELLY, PETER MICHAEL;  
BOYLE, CRAIG JAMES STEWART y  
EBERLIN, ALEXANDER REDVERS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 570 135 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

Sal y solvatos de un derivado de tetrahydroisoquinolina

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud estadounidense provisional con número de serie 61/366.367, presentada el 21 de julio de 2010.

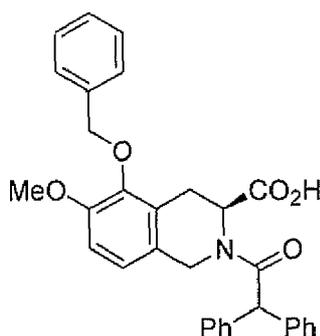
Campo de la invención

Se describe el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico en forma sustancialmente pura junto con su sal de sodio y solvatos. También se describen métodos para preparar el compuesto, su sal de sodio y sus solvatos y composiciones farmacéuticas que los comprenden.

10 Antecedentes de la invención

El ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico, que es un enantiómero del racemato conocido como PD 126055, es un antagonista de los receptores de angiotensina II tipo 2 (AT<sub>2</sub>) y se describe en el documento US 5.246.943 y en Klutchko *et al.*, 1994, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 4:57-62.

15 Se ha identificado recientemente que los antagonistas de los receptores AT<sub>2</sub> son útiles en el tratamiento del dolor, particularmente dolor inflamatorio (documento WO 2007/106938) y dolor neuropático (documento WO 2006/066361) y se ha identificado el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico:



Compuesto 1

como candidato a fármaco.

20 Se ha obtenido el compuesto 1 a partir del racemato mediante recrystalización de la sal de  $\alpha$ -metilbencilamina (US 5.246.943). Sin embargo, este método no proporciona cantidades adecuadas del compuesto 1 con los altos niveles requeridos de pureza química y enantiomérica necesarios para fines farmacéuticos.

25 Aunque el racemato, es decir: el ácido (R,S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico, es un compuesto cristalino y los inventores han identificado dos formas cristalinas diferentes, el compuesto 1 es un compuesto amorfo y a pesar de esfuerzos importantes, no se ha identificado ninguna forma cristalina del compuesto. Existen importantes dificultades en el desarrollo del compuesto 1 para fines farmacéuticos, incluyendo:

1. la forma amorfa es difícil de purificar hasta los niveles requeridos para fines farmacéuticos sin recurrir a métodos cromatográficos caros y que llevan mucho tiempo;
2. la forma amorfa del compuesto 1 retiene disolventes residuales que son difíciles de eliminar hasta niveles aceptables para uso farmacéutico; y
- 30 3. la forma amorfa del compuesto 1 tiene una solubilidad en agua muy baja y esto limita su biodisponibilidad oral.

Existe la necesidad de una forma del compuesto 1 que sea adecuada para el desarrollo farmacéutico, incluyendo una forma que pueda obtenerse en grandes cantidades con pureza química y pureza enantiomérica aceptables y que tenga solubilidad en agua aceptable.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la sal de sodio del compuesto 1 tenía propensión a formar solvatos altamente cristalinos que no sólo permiten que se fabrique este material con pureza química mejorada sino que también permiten que se mejore la pureza enantiomérica mediante recristalización en el caso de que se produzca cierta epimerización en la posición 3 quiral del anillo de tetrahidroisoquinolina durante el proceso de fabricación. También se encontró que la sal de sodio tenía buenas características de biodisponibilidad oral.

#### Sumario de la invención

En un primer aspecto, se proporciona la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico y solvatos del mismo, en forma amorfa, o en forma de un solvato cristalino, especialmente un etanolato, iso-propanolato o hidrato. En algunas realizaciones, el hidrato es un monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato o un hidrato completo o fraccionario en entre uno y cinco. En algunas realizaciones, el hidrato tiene de 2 a 5 moléculas de agua.

También se describe en el presente documento el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico en forma sustancialmente pura.

En una realización particular, el compuesto tiene una pureza enantiomérica de un e.e. > del 97% y/o una pureza química > del 96%.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la sal de sodio del ácido de (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico, o un solvato de la sal de sodio junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico está en forma amorfa o en forma de un solvato cristalino.

En algunas realizaciones, la composición está en una forma sólida, especialmente para administración oral.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico que comprende:

(i) tratar el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico con alcóxido de sodio;

(ii) formar un solvato de alcohol cristalino de la sal de sodio resultante del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico; y

(iii) recristalizar el solvato formado en la etapa (ii).

En una realización, el alcóxido de sodio es etóxido de sodio. En una realización particular, el solvato cristalino es el solvato de etanol o iso-propanol, especialmente el solvato de iso-propanol.

En algunas realizaciones, la molécula de solvato del solvato de alcohol cristalino formada en la etapa (ii) se intercambia por otra molécula de solvato antes, durante o después de la etapa (iii). En una realización particular, el solvato de alcohol cristalino obtenido en la etapa (ii) es un solvato de etanol y la recristalización de la etapa (iii) se logra en un disolvente que comprende iso-propanol de manera que el solvato cristalino obtenido en la etapa (iii) es el solvato de iso-propanol de la sal de sodio del compuesto 1. En algunas realizaciones, la recristalización de la etapa (iii) se realiza en un disolvente orgánico no acuoso.

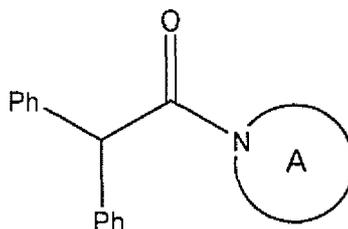
El método puede comprender además la etapa de intercambio del alcohol dentro del solvato por moléculas de agua para preparar hidratos amorfos o cristalinos de la sal de sodio.

El método puede comprender además la etapa de secado del solvato de alcohol o hidrato para proporcionar la sal de sodio amorfa del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico. En algunas realizaciones, el secado es mediante liofilización.

El método puede comprender además la etapa de acidificación de la sal de sodio para proporcionar al ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico una forma sustancialmente pura.

En aún un aspecto adicional, se proporciona un método de preparación de un solvato de alcohol de la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico que comprende las etapas de:

(i) acilar el átomo de nitrógeno de isoquinolina del ácido (S)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico con una amida cíclica activada de fórmula:



en la que el anillo A es un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros; y

5 (ii) tratar el producto de la etapa (i) con una sal de alcóxido en un disolvente de alcohol.

En algunas realizaciones, el heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros es pirazol, pirrol, imidazol, 1,2,3-triazol o 1,2,4-triazol, especialmente pirazol. En algunas realizaciones, la sal de alcóxido es etóxido de sodio. En algunas realizaciones, el disolvente de alcohol es etanol.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 ilustra el espectro de difracción de rayos X de polvo característico de una sal de sodio cristalina del compuesto 2.

La figura 2 ilustra el espectro de difracción de rayos X de polvo característico de un solvato de etanol cristalino de la sal de sodio (el compuesto 4).

15 La figura 3 ilustra el espectro de difracción de rayos X de polvo característico de un solvato de iso-propanol cristalino de la sal de sodio (el compuesto 5).

La figura 4 ilustra el espectro de difracción de rayos X de polvo característico de un hidrato cristalino de la sal de sodio que tiene al menos tres moléculas de agua (el compuesto 6).

La figura 5 ilustra el espectro de difracción de rayos X de polvo característico de un hidrato cristalino de la sal de sodio que tiene aproximadamente dos moléculas de agua (el compuesto 7).

20 La Figura 6 ilustra un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido característico de una sal de sodio amorfa del compuesto 2.

La figura 7 ilustra un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido característico de un solvato de etanol cristalino de la sal de sodio (el compuesto 4).

25 La figura 8 ilustra un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido característico de un solvato de iso-propanol cristalino de la sal de sodio (el compuesto 5).

La figura 9 ilustra un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido característico de un hidrato cristalino de la sal de sodio que tiene al menos tres moléculas de agua (el compuesto 6).

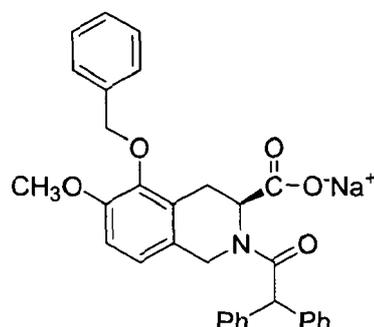
La figura 10 ilustra un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido característico de un hidrato cristalino de la sal de sodio que tiene aproximadamente dos moléculas de agua (el compuesto 7).

30 La figura 11 representa la concentración en plasma media del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico (compuesto 1) a lo largo del tiempo tras la administración oral de los compuestos 1, 2 (sal de sodio amorfa), 6 y 7 a perros. La figura 11A representa las curvas de la concentración en plasma media frente al tiempo en una escala lineal y la figura 11B representa las curvas de la concentración en plasma media frente al tiempo en una escala logarítmica.

35 La figura 12A proporciona la  $C_{\text{máx}}$  del compuesto 1 como ácido libre tras la administración oral de los compuestos 1, 2 (sal de sodio amorfa), 6 y 7 a perros. La figura 12B proporciona el  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})}$  del compuesto 1 como ácido libre tras la administración oral de los compuestos 1, 2 (sal de sodio amorfa), 6 y 7 a perros.

Descripción detallada de la invención

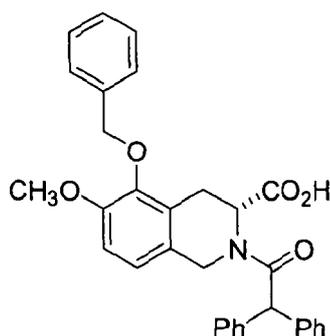
La sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico (denominado a continuación en el presente documento compuesto 2) tiene la fórmula:



Compuesto 2

Este compuesto es un antagonista de los receptores AT<sub>2</sub> con usos farmacéuticos en el tratamiento del dolor, especialmente dolor inflamatorio y neuropático. Se han identificado previamente el compuesto 1 y su mezcla racémica como antagonista de los receptores AT<sub>2</sub>. Sin embargo, se ha encontrado ahora que la sal de sodio (el compuesto 2) tiene ventajas particulares en relación con la facilidad de fabricación, pureza y biodisponibilidad oral que no se encuentran en el ácido libre (el compuesto 1) u otras sales.

Aunque la forma racémica es cristalina, no se ha aislado el enantiómero individual representado por el compuesto 1 en una forma cristalina y, por tanto, es difícil la purificación hasta niveles farmacéuticamente aceptables, incluyendo la retirada de su enantiómero (R) (el compuesto 3):



Compuesto 3

Además, puede producirse epimerización en la posición 3 quiral del compuesto 1 en ciertas condiciones de fabricación y, por tanto, obtener y mantener el compuesto 1 con una alta pureza enantiomérica puede ser un reto.

Los presentes inventores han encontrado que la sal de sodio, el compuesto 2, puede aislarse en forma cristalina como solvato, particularmente un solvato de alcohol. Esto puede lograrse directamente a partir de la preparación del compuesto 1 y, por tanto, es posible la purificación mediante cristalización y puede lograrse una alta pureza enantiomérica. Además, si se produce epimerización del centro quiral en la posición 3, puede usarse la cristalización para retirar el enantiómero no deseado y mejorar la pureza enantiomérica. Los solvatos también pueden intercambiarse entre sí y puede lograrse la conversión a formas de hidrato con pureza y niveles de disolventes residuales farmacéuticamente aceptables. Estas formas de hidrato incluyen formas cristalinas así como una forma amorfa, preparándose esta última mediante liofilización.

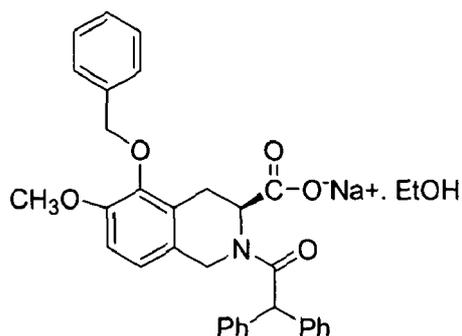
En una realización particular, el compuesto 2 está en forma amorfa. En una realización de este tipo, la forma amorfa presenta un espectro de <sup>13</sup>C-RMN de estado sólido que comprende picos a aproximadamente 55,2, 109,8, 128,4 y 151,7 ppm. En otra realización de este tipo, la forma amorfa presenta un espectro de <sup>13</sup>C-RMN de estado sólido sustancialmente igual al de la figura 6. En otra realización, el espectro de <sup>13</sup>C-RMN de estado sólido tiene picos a aproximadamente 26,2, 29,8, 39,0, 41,9, 45,7, 55,2, 60,4, 73,6, 94,4, 109,8, 121,3, 128,4, 139,9, 145,0, 151,7, 172,2, 175,7 y 178,8 ppm.

En otra realización, el compuesto 2 está en una forma cristalina. En una realización de este tipo, la forma cristalina de sal de sodio no solvatada presenta un espectro de XRPD que comprende al menos un pico a aproximadamente 9,6 grados 2θ. En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD que comprende un pico a aproximadamente 9,6 grados 2θ y que comprende al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en

- aproximadamente 6,0 y 19,6 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD que comprende un pico a aproximadamente 9,6 grados  $2\theta$ , al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 6,0 y 19,6 grados  $2\theta$ , y al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 14,0, 17,9, 20,6, 21,8, 23,3 y 23,9 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD sustancialmente igual que el de la figura 1. En otra realización de este tipo, la forma cristalina no solvatada tiene un espectro de difracción de rayos X con picos a  $2\theta = 5,5, 6,0, 6,9, 8,5, 9,6, 11,0, 13,3, 14,0, 16,1, 16,7, 17,9, 18,4, 19,6, 20,6, 21,8, 22,3, 23,3, 23,9, 25,5, 26,3$  y 27,6.

En algunas realizaciones, el solvato se forma a partir de agua o un disolvente alcohólico, especialmente agua, etanol o iso-propanol.

- 10 En una realización, el solvato de la sal de sodio es el solvato de etanol (etanolato) (el compuesto 4):

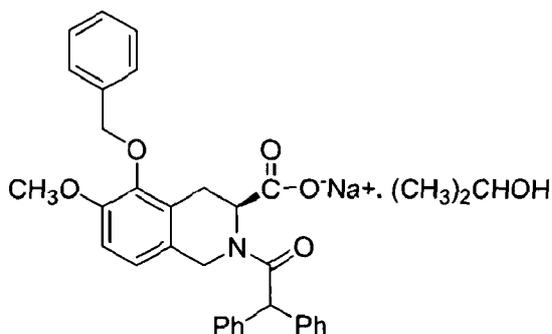


Compuesto 4

- En una realización, este compuesto puede aislarse en una forma cristalina. En una realización de este tipo, el solvato de etanol presenta un espectro de difracción de rayos X ("XRPD") que comprende un pico a aproximadamente 14,3 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina de sal de sodio de solvato de etanol presenta un espectro de XRPD que comprende un pico a aproximadamente 14,7 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina de sal de sodio de solvato de etanol presenta un espectro de XRPD que comprende un pico, al menos dos, del grupo que comprende a aproximadamente 14,3, 14,7, 26,9 y 29,7 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD sustancialmente igual que el de la figura 2. En otra realización de este tipo, la forma cristalina tiene un espectro de difracción de rayos X con picos a  $2\theta = 5,5, 6,7, 8,0, 8,7, 9,3, 11,1, 13,4, 14,3, 14,7, 15,8, 16,1, 16,6, 17,4, 17,8, 18,8, 20,3, 20,9, 21,4, 22,2, 22,8, 24,2, 25,4, 26,9, 27,6, 28,7, 29,7, 30,3, 31,3, 32,1, 33,5, 35,7$  y 41,0.

- En una realización, el solvato de etanol de la forma cristalina de sal de sodio presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido que comprende picos a aproximadamente 18,4, aproximadamente 139,7 y aproximadamente 141,4 ppm. En otra realización de este tipo, el solvato de etanol de la forma cristalina de sal de sodio presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido sustancialmente igual que el de la figura 7. En otra realización, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido tiene picos a aproximadamente 18,4, 25,9, 28,6, 38,1, 41,9, 47,0, 52,0, 54,1, 55,6, 57,5, 74,1, 81,1, 110,8, 118,5, 126,4, 128,1, 137,6, 139,7, 141,4, 143,9, 151,3, 171,6 y 180,2 ppm.

En otra realización, el solvato de la sal de sodio es el solvato de iso-propanol (iso-propanolato) (el compuesto 5):



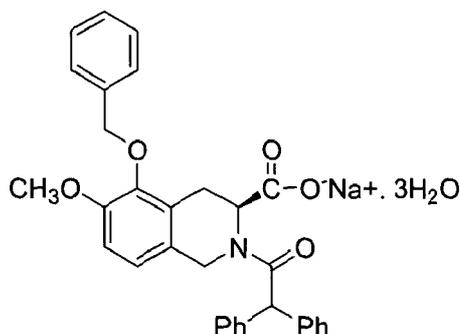
Compuesto 5

Este compuesto puede aislarse en una forma cristalina. En una realización de este tipo, el solvato de iso-propanol de la forma cristalina de sal de sodio presenta un espectro de XRPD que comprende al menos un pico seleccionado del

5 grupo que consiste en aproximadamente 26,0, 26,6, 27,2, 28,3 y 29,3 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD que comprende al menos dos picos seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente 25,0, 26,0, 26,6, 27,2, 28,3 y 29,3 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD que comprende al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 26,0, 26,6, 27,2, 28,3 y 29,3 grados  $2\theta$ , y al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 10,8, 14,0, 21,1, 21,9 y 22,5 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD sustancialmente igual que el de la figura 3. En otra realización, esta forma cristalina de solvato de iso-propanol tiene un espectro de difracción de rayos X con picos a  $2\theta = 5,4, 6,6, 7,9, 8,6, 9,2, 10,8, 13,4, 14,0, 15,9, 16,4, 17,3, 17,6, 18,6, 20,0, 20,5, 21,1, 21,9, 22,5, 23,0, 24,0, 25,0, 25,5, 26,0, 26,6, 27,2, 28,3$  y 29,3.

15 En una realización, el solvato de iso-propanol de la forma cristalina de sal de sodio presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido que comprende picos a aproximadamente 63,1 y aproximadamente 140,7 ppm. En otra realización de este tipo, el solvato de iso-propanol de la forma cristalina de sal de sodio presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido sustancialmente igual que el de la figura 8. En otra realización, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido tiene picos a aproximadamente 25,1, 28,0, 41,4, 46,8, 48,2, 53,8, 55,8, 56,8, 58,1, 63,1, 74,0, 111,0, 118,7, 126,5, 128,0, 137,7, 140,7, 143,7, 151,4, 171,2, 173,2 y 180,0 ppm.

En otra realización, el solvato de la sal de sodio es el solvato de trihidrato (el compuesto 6) que contiene tres moléculas de agua por cada molécula del compuesto 2.

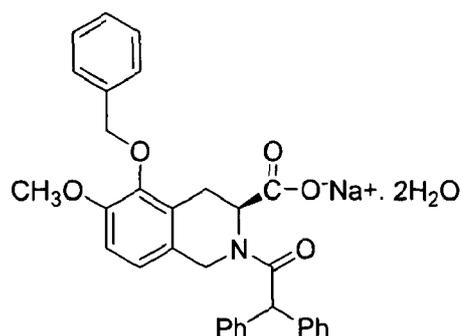


Compuesto 6

20 Algunos estudios indican que el compuesto 6 puede tener cuatro o más moléculas (un hidrato fraccionario) de agua por cada molécula del compuesto 2. Independientemente de la cantidad exacta de agua, el hidrato del compuesto 6 puede aislarse en forma cristalina. En una realización de este tipo, el hidrato de la forma cristalina de sal de sodio que tiene entre tres y 5 moléculas de agua presenta un espectro de XRPD que comprende un pico a aproximadamente 15,2 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD que comprende un pico a aproximadamente 15,2 grados, y al menos dos picos seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente 4,8, 7,3, 12,0, 12,6, 23,5 y 24,5 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD sustancialmente igual que el de la figura 4. En otra realización, esta forma de cristalina de hidrato tiene un espectro de difracción de rayos X con picos a  $2\theta = 4,8, 5,5, 7,3, 8,3, 9,9, 12,0, 12,6, 15,2, 16,7, 17,2, 17,9, 19,0, 21,5, 23,5$  y 24,5.

30 En una realización, el hidrato de la forma cristalina de sal de sodio que tiene aproximadamente de 3 a menos de 5 moléculas de agua presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido que comprende picos a aproximadamente 53,7, aproximadamente 122,9 y aproximadamente 128,1 ppm. En otra realización de este tipo, el hidrato de la forma cristalina de sal de sodio que tiene aproximadamente de 3 a menos de 5 moléculas de agua presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido sustancialmente igual que el de la figura 9. En otra realización, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido tiene picos a aproximadamente 23,7, 26,2, 28,4, 38,1, 45,5, 47,6, 53,7, 55,8, 59,3, 74,0, 108,6, 110,5, 120,5, 122,9, 128,1, 130,4, 137,7, 139,8, 143,9, 145,3, 150,9, 152,0, 171,6, 173,3 y 177,3 ppm.

35 En aún otra realización, el solvato de la sal de sodio es el solvato de dihidrato (el compuesto 7) que contiene dos moléculas de agua por cada molécula del compuesto 2.



Compuesto 7

Algunos estudios indican que el compuesto 7 puede tener ligeramente menos de dos, pero más de una molécula de agua (un hidrato fraccionario) por cada molécula del compuesto 2. Independientemente de la cantidad exacta de agua, el hidrato del compuesto 7 puede aislarse en forma cristalina. En una realización de este tipo, el hidrato de la forma cristalina de sal de sodio que tiene 1-2 moléculas de agua presenta un espectro de XRPD que comprende al menos un pico a aproximadamente 19,3 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD que comprende picos a aproximadamente 19,3 y 18,2 grados  $2\theta$ . En otra realización de este tipo, la forma cristalina presenta un espectro de XRPD sustancialmente igual que el de la figura 5. En otra realización, esta forma de cristalina de hidrato tiene un espectro de difracción de rayos X con picos a  $2\theta = 4,8, 5,5, 7,3, 8,2, 12,1, 12,8, 15,8, 16,9, 18,2, 19,3$  y  $25,6$ .

En una realización, el hidrato de la forma cristalina de sal de sodio que tiene aproximadamente 1-2 moléculas de agua presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido que comprende picos a aproximadamente 55,7, aproximadamente 128,2 y aproximadamente 151,3 ppm. En otra realización de este tipo, el hidrato de la forma cristalina de sal de sodio que tiene aproximadamente 1-2 moléculas de agua presenta un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido sustancialmente igual que el de la figura 10. En otra realización, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido tiene picos a aproximadamente 25,8, 28,2, 46,6, 55,7, 73,7, 75,1, 109,3, 119,7, 128,2, 137,8, 139,6, 144,7, 151,3, 172,1 y 178,2 ppm.

Tal como se usa en el presente documento, el término “pureza enantiomérica” se refiere al porcentaje de enantiómero (S) presente en comparación con el enantiómero (R) no deseado. Por ejemplo una pureza del 90% tiene el 90% de enantiómero (S) y el 10% de enantiómero (R) y una pureza del 100% sólo tiene enantiómero (S) y no tiene enantiómero (R). En realizaciones particulares, la pureza del enantiómero (S) es alta, es decir de más del 80%, especialmente de más del 85%, el 87,5%, el 90%, el 92,5%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% e incluye el 100%. La pureza enantiomérica también puede notificarse como exceso enantiomérico (e.e.). El exceso enantiomérico se expresa habitualmente como un porcentaje calculado mediante la siguiente ecuación:

$$((R-S)/(R+S)) \times 100 = \% \text{ de e.e.}$$

donde R y S son las fracciones respectivas de los enantiómeros de manera que  $R + S = 1$ . En realizaciones particulares, el e.e. del enantiómero (S) es alto, es decir de más del 80%, especialmente de más del 85%, el 87,5%, el 90%, el 92,5%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% e incluye el 100%.

Tal como se usa en el presente documento, el término “pureza química” se refiere al porcentaje de impurezas presentes en el producto. Las impurezas pueden estar en forma, por ejemplo, de la presencia de disolventes no deseados, productos de degradación o productos de oxidación. En realizaciones particulares, la pureza química es alta, es decir más del 80% del producto es el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico, especialmente más del 85%, el 87,5%, el 90%, el 92,5%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% e incluye el 100%.

El término “forma sustancialmente pura” se refiere a un producto que tiene una pureza química mayor del 96%, especialmente mayor del 97%, el 98% o el 99% y más especialmente una pureza química del 100% y/o un e.e. mayor del 97%, especialmente un e.e. mayor del 98% o el 99% y más especialmente un e.e. del 100%.

Tal como se usa en el presente documento, el significado del término “aproximadamente” depende del contexto en el que se usa. Cuando se usa con respecto a la posición de un pico en un espectro de difracción de rayos X de polvo (XRPD), el término “aproximadamente” incluye picos dentro de  $\pm 0,1$  grados  $2\theta$  con respecto a la posición establecida. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, un pico de XRPD a “aproximadamente 10,0 grados  $2\theta$ ” significa que el pico establecido aparece a desde 9,9 hasta 10,1 grados  $2\theta$ . Cuando se usa con respecto a la posición de un pico en un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido, el término “aproximadamente” incluye picos dentro de  $\pm 0,2$  ppm de la posición establecida. Por ejemplo, tal como se usa en el presente

documento, un pico del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN a "aproximadamente 100,0 ppm" significa que el pico establecido aparece a desde 99,8 hasta 100,2 ppm.

En la técnica se conocen métodos de síntesis para la preparación del compuesto 1. La síntesis de la mezcla racémica que contiene el compuesto 1 y su enantiómero (R), el compuesto 3, seguida por la resolución de los enantiómeros usando formación de sal quiral se describe en el documento US 5.246.943 y Klutchko *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett., 1994, 4:57-62. La sal quiral usada para la resolución fue 1-(-)- $\alpha$ -metilbencilamina.

La sal de sodio, el compuesto 2, puede obtenerse tratando el compuesto 1 con una disolución acuosa de hidróxido de sodio. Sin embargo, este método prepara el compuesto 2 como un residuo aceitoso o una goma en vez de como un sólido cristalino. No se obtienen formas cristalinas de la sal de sodio a menos que se elijan sistemas de disolventes que conducen a la formación de sólidos cristalinos en forma de diferentes solvatos. Por ejemplo, el solvato de etanol, el compuesto 4, puede obtenerse tomando la forma no cristalina del compuesto 2 preparada usando una disolución acuosa de hidróxido de sodio y tratándola con etanol o, más preferiblemente, tratando el compuesto 1 con etóxido de sodio en etanol. De manera similar, el solvato de iso-propanol, el compuesto 5, puede prepararse tomando la forma no cristalina del compuesto 2 preparada usando una disolución acuosa de hidróxido de sodio y tratándola con iso-propanol. El compuesto 5 también podría prepararse tratando el compuesto 1 con iso-propóxido de sodio en sistemas de disolventes que contienen iso-propanol.

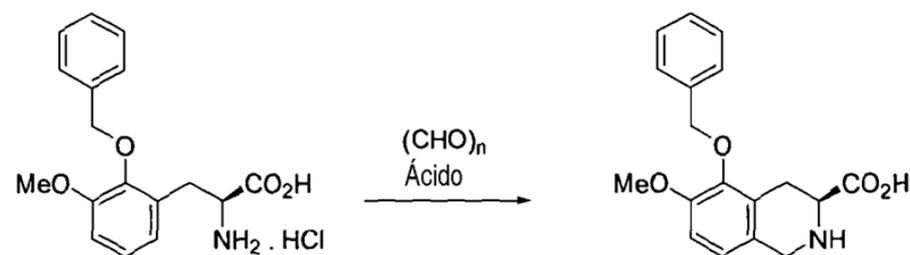
El compuesto 2 o sus solvatos también pueden obtenerse recristalizando un solvato de alcohol del compuesto 2 en un disolvente orgánico o un disolvente orgánico acuoso (disolvente orgánico con un porcentaje de agua añadido). Se obtuvieron solvatos cristalinos mediante recristalización en acetato de etilo (EtOAc)/agua al 10%, metil etil cetona (MEK), 1-propanol, EtOAc, terc-butil metil éter (TBME) y disolventes hidrocarbonados tales como heptano. La recristalización en acetonitrilo dio una forma cristalina no solvatada de la sal de sodio.

Los hidratos, los compuestos 6 y 7, pueden obtenerse mediante exposición del etanolato o iso-propanolato cristalino a humedad, especialmente humedad atmosférica. A alta humedad tal como humedad relativa del 70%, se forma el compuesto 6, un hidrato, en humedad moderada tal como humedad relativa del 40%, se forma el compuesto 7, un hidrato. Tras secado o liofilización de las diferentes formas de hidrato, se produce la sal de sodio amorfa (el compuesto 2).

La forma amorfa del compuesto 2 también puede formarse mediante liofilización de un solvato de alcohol del compuesto 2 en agua.

Alternativamente, el compuesto 2 puede prepararse mediante síntesis asimétrica y aislarse la sal de sodio como solvato cristalino al final de la síntesis. En la técnica se conocen métodos para preparar  $\alpha$ -aminoácidos quirales no naturales (por ejemplo, Burk *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 10125-10138) y tales métodos puede aplicarse a la síntesis de una orto-fenilmetiloxi-meta-metoxi-fenilalanina quiral. Debe tenerse cuidado en usar condiciones que sean lo suficientemente suaves como para permitir la retención del grupo O-bencilo colgante.

Una vez preparado el derivado de fenilalanina quiral puede transformarse en una 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina usando la reacción de Pictet-Spengler tal como se muestra en el esquema 1 y se describe en el documento US 5.246.943.



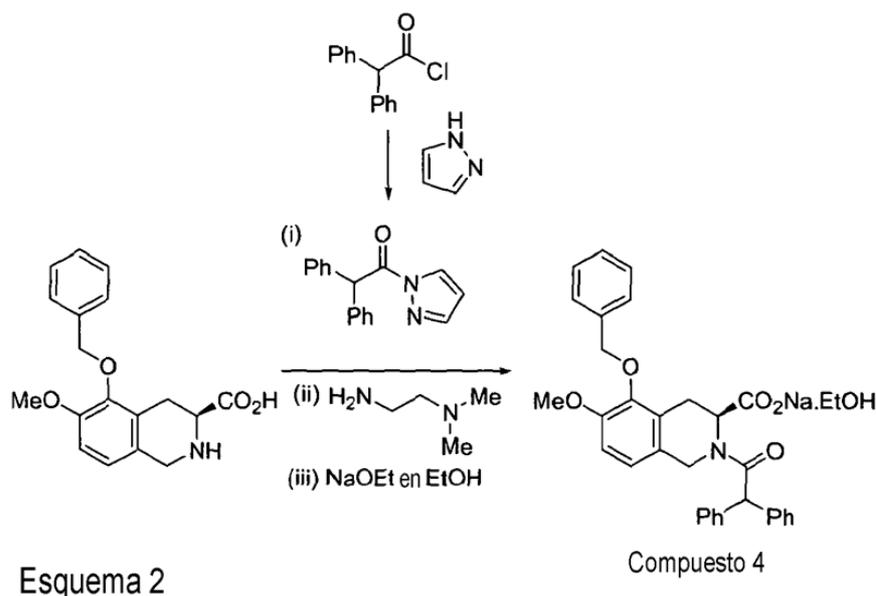
Esquema 1

Puede lograrse la acilación del átomo de nitrógeno de isoquinolina mediante reacción de la isoquinolina con ácido 2,2-difeniletanoico que se ha activado para la reacción para formar un enlace amida, por ejemplo, cloruro, anhídrido o una amida cíclica activa del ácido 2,2-difeniletanoico. Esta reacción debe controlarse cuidadosamente ya que pueden disminuir los rendimientos mediante la formación de subproductos diméricos, esterificados o epimerizados. Pueden evitarse o reducirse las reacciones secundarias usando condiciones anhidras y protegiendo el ácido carboxílico durante la acilación del nitrógeno de isoquinolina con un cloruro de ácido. Por ejemplo, durante la formación del enlace amida usando cloruro del ácido 2,2-difeniletanoico, puede usarse un grupo protector fácilmente hidrolizado, tal como un grupo trimetilsililo, que se hidroliza durante el tratamiento final acuoso, para impedir o

reducir las reacciones secundarias en el ácido carboxílico. Se conocen en la técnica grupos protectores adecuados y pueden encontrarse en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, 1999, John Wiley & Sons.

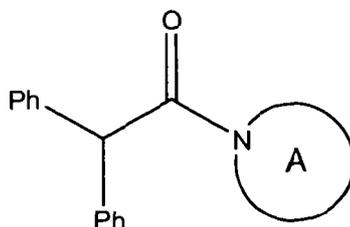
5 El uso de una amida cíclica activa del ácido 2,2-difeniletanoico reduce la necesidad de esta protección temporal del ácido isoquinolin-carboxílico ya que la amida cíclica activa es más selectiva para la reacción con el nitrógeno de isoquinolina. La amida cíclica activa puede formarse mediante reacción del cloruro del ácido 2,2-difeniletanoico con un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros. Los ejemplos de heterociclos adecuados incluyen pirazol, pirrol, imidazol, 1,2,3-triazol y 1,2,4-triazol. En el esquema 2 se muestra un ejemplo usando pirazol.

10 El conocimiento de diferentes solvatos y formas físicas del compuesto 2 se incorpora en el procedimiento de síntesis global preparando el solvato de etanol de la sal de sodio, el compuesto 4, por ejemplo, añadiendo etóxido de sodio en etanol al extracto orgánico tras el tratamiento final acuoso de la reacción de acilación y aislando el producto intermedio cristalino directamente de la mezcla de reacción tal como se muestra en el esquema 2.



15 Por consiguiente, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de preparación de un solvato de alcohol de la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico que comprende las etapas de:

(i) acilar el átomo de nitrógeno de isoquinolina del ácido (S)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico con una amida cíclica activada de fórmula:



20 en la que el anillo A es un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros; y

(ii) tratar el producto de la etapa (i) con una sal de alcóxido en un disolvente de alcohol.

25 En algunas realizaciones, el heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros es pirazol, pirrol, imidazol, 1,2,3-triazol o 1,2,4-triazol. En una realización, el heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros es pirazol. En algunas realizaciones, la sal de alcóxido es etóxido de sodio. En algunas realizaciones, el disolvente de alcohol es etanol. En algunas realizaciones, se usa la combinación de etóxido de sodio y etanol.

En algunas realizaciones, el producto de la etapa (i) se trata con base, tal como una base de amina, antes de la

etapa (ii).

5 El compuesto 4 también puede purificarse adicionalmente mediante recristalización en sistemas de disolventes que contienen etanol para proporcionar el compuesto 4 cristalino. Asimismo, si se preparó el compuesto 5, puede purificarse mediante recristalización en un sistema de disolventes con iso-propanol. Los solvatos de alcohol pueden convertirse mediante cristalización en un sistema de disolventes que contiene alcohol diferente. Por ejemplo, el compuesto 5 puede prepararse mediante recristalización en iso-propanol o mezclas de iso-propanol y otro disolvente polar tal como acetato de etilo, para dar el solvato de iso-propanol (el compuesto 5).

Los compuestos 4 ó 5 pueden almacenarse, convertirse en las diferentes formas cristalinas de los hidratos del compuesto 2 o disolverse en agua y liofilizarse para proporcionar el compuesto 2 amorfo.

10 La sal de sodio, el compuesto 2, puede prepararse en formas cristalina o amorfa adecuadas para su uso en una composición farmacéutica, tratando el ácido libre (el compuesto 1), o bien durante la síntesis o bien después de su aislamiento, con un alcóxido de sodio, formándose entonces un solvato cristalino.

15 Tal como se usa en el presente documento, un “alcóxido” se refiere a un ion formado mediante la eliminación del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de un alcohol. Los alcóxidos adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen metóxido, etóxido, propóxido, iso-propóxido y butóxido.

El solvato cristalino del compuesto 2 puede formarse mediante tratamiento con el alcóxido de sodio usando un disolvente adecuado. Por ejemplo, el solvato de etanol del compuesto 2 puede formarse mediante tratamiento con etóxido de sodio en etanol. El solvato de iso-propanol puede formarse mediante tratamiento con iso-propóxido de sodio en iso-propanol.

20 Una vez que se aísla el solvato cristalino, se recristaliza en un disolvente adecuado. Puede realizarse la recristalización del solvato aislado o puede intercambiarse el solvato por otro solvato antes o durante la recristalización. Por ejemplo, puede aislarse el solvato de etanol y luego intercambiarse la molécula de etanol por una molécula de iso-propanol para dar el solvato de iso-propanol que se recristaliza.

25 La solvato de alcohol recristalizado puede convertirse entonces en formas de hidrato a través de la exposición a humedad atmosférica y/o secarse o liofilizarse para dar el compuesto 2 amorfo con alta pureza química y enantiomérica. En algunas realizaciones, el hidrato o solvato de alcohol cristalino se disuelve en agua y se liofiliza para dar el compuesto 2 amorfo con alta pureza química y enantiomérica o forma sustancialmente pura.

La sal de sodio (el compuesto 2) puede acidificarse para dar el ácido libre (el compuesto 1) en forma sustancialmente pura.

30 Aunque es posible usar los compuestos de la invención en forma pura, se usa de la manera más adecuada en una composición farmacéutica junto con al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El/los portador(es), diluyente(s) o excipiente(s) debe(n) ser “aceptable(s)” en el sentido de ser compatible(s) con los demás componentes de la composición y no perjudicial(es) para el receptor de la misma.

35 Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración mediante inhalación o insuflación. Los compuestos de la invención, especialmente el compuesto 2, junto con un adyuvante, portador, excipiente o diluyente convencional, pueden ponerse por tanto en forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias de las mismas, y en tal forma pueden emplearse como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas llenas, o líquidos tales como disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, o cápsulas llenas con los mismos, todos para uso oral, en forma de supositorios para administración rectal; o en forma de disoluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluyendo subcutáneo). Tales composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria de las mismas pueden comprender componentes convencionales en proporciones convencionales, y tales formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo acorde con el rango de dosificación diaria pretendido que vaya a emplearse. Las formulaciones que contienen diez (10) miligramos o (25) miligramos de principio activo o, de manera más amplia, de 0,1 a doscientos (200) miligramos, por comprimido o cápsula, son por consiguiente formas de dosificación unitaria representativas adecuadas. Los compuestos de la presente invención, especialmente el compuesto 2, pueden administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación oral y parenteral. En una realización particular, el compuesto 2 amorfo se formula como forma de dosificación sólida.

50 Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser o bien sólidos o bien líquidos. Para las formulaciones líquidas, se usan la sal de sodio y sus solvatos para obtener el compuesto 2 a un nivel de pureza que es adecuado para su uso en

composiciones farmacéuticas. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes de disgregación de comprimidos o un material de encapsulación.

- 5 En polvos, el portador es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido.

En comprimidos, el componente activo se mezcla con el portador que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta para dar la conformación y el tamaño deseados.

- 10 En una realización particular, los polvos y comprimidos contienen desde el cinco o el diez hasta aproximadamente el setenta por ciento del compuesto activo. Portadores adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, celulosa microcristalina, dióxido de silicio coloidal, una cera con bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como portador que proporciona una cápsula en la que el componente activo, con o sin portadores, está rodeado por un portador, que está por tanto en asociación con el mismo. De manera similar, se incluyen sellos y pastillas para chupar. Pueden usarse comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos y pastillas para chupar como formas sólidas adecuadas para la administración oral.
- 15

- 20 Para preparar supositorios, se funde en primer lugar una cera con bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y se dispersa el componente activo de manera homogénea en la misma, tal como mediante agitación. Entonces se vierte la mezcla homogénea fundida en moldes de tamaño conveniente, se permite que se enfríe, y de ese modo que solidifique.

Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contienen además del principio activo portadores que se conoce en la técnica que son apropiados.

- 25 Las preparaciones en forma líquida incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, disoluciones acuosas o de agua-propilenglicol. Por ejemplo, pueden formularse preparaciones líquidas para inyección parenteral como disoluciones en disolución acuosa de polietilenglicol.

- 30 El agente activo puede formularse para la administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua) y puede presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de múltiples dosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido mediante el aislamiento aséptico de sólido estéril o mediante liofilización a partir de disolución, para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso.
- 35

Pueden prepararse disoluciones acuosas adecuadas para uso oral disolviendo el compuesto activo en agua y añadiendo colorantes, aromas, agentes estabilizantes y espesantes adecuados, según se desee.

- 40 Pueden producirse suspensiones acuosas adecuadas para uso oral dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, u otros agentes de suspensión bien conocidos. En algunas realizaciones, cuando la solubilidad en agua y/o biodisponibilidad oral es baja, por ejemplo, con el compuesto 1, el compuesto puede formularse en una formulación que contiene lípido tal como aceite de maíz o formularse como un gel y administrarse en una cápsula.

- 45 También se incluyen preparaciones en forma sólida que se pretende que se conviertan, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para la administración oral. Tales formas líquidas incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromas, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares.

- 50 Para la administración tópica a la epidermis, los compuestos según la invención pueden formularse como pomadas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Las pomadas y las cremas pueden formularse, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Pueden formularse lociones con una base acuosa u oleosa y en general también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden agente activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o goma tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.

5 Las disoluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal mediante medios convencionales, por ejemplo con un cuentagotas, una pipeta o una pulverización. Las formulaciones pueden proporcionarse en forma de dosis única o de múltiples dosis. En el último caso de un cuentagotas o una pipeta, esto puede lograrse mediante la administración por parte del paciente de un volumen apropiado, predeterminado de la disolución o suspensión. En el caso de una pulverización, esto puede lograrse por ejemplo por medio de una bomba de pulverización de atomización dosificadora. Para mejorar la administración y retención nasal, el compuesto según la invención puede  
10 encapsularse con ciclodextrinas, o formularse con los agentes que se espera que potencien su administración y retención en la mucosa nasal.

También puede lograrse la administración al aparato respiratorio por medio de una formulación en aerosol en la que se proporciona el principio activo en un envase presurizado con un propelente adecuado tal como un clorofluorocarbono (CFC) por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener de manera conveniente un tensioactivo tal como lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse mediante la provisión de una válvula de dosificación.

15 Alternativamente, el principio activo puede proporcionarse en forma de un polvo seco, por ejemplo una mezcla en polvo del compuesto en una base de polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP).

De manera conveniente, el portador en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo en cápsulas o cartuchos, por ejemplo, de gelatina, o envases de tipo blíster a partir de los que puede administrarse el polvo por medio de un inhalador.

25 En formulaciones destinadas para la administración al aparato respiratorio, incluyendo formulaciones intranasales, el compuesto tendrá generalmente un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo del orden de 1 a 10 micrómetros o menos. Un tamaño de partícula de este tipo puede obtenerse mediante medios conocidos en la técnica, por ejemplo mediante micronización.

Cuando se desee, pueden emplearse formulaciones adaptadas para proporcionar la liberación sostenida del principio activo.

30 En una realización particular, las preparaciones farmacéuticas están en formas de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades diferenciadas de preparación, tales como comprimidos en paquetes, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, un comprimido, un sello o una pastilla para chupar en sí misma, o puede  
35 ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma envasada.

En realizaciones particulares, las preparaciones farmacéuticas son formas de dosificación oral sólidas tales como comprimidos o cápsulas.

Ahora se describirá la invención con referencia a los siguientes ejemplos que ilustran algunos aspectos particulares de la presente invención. Sin embargo, ha de entenderse que la particularidad de la siguiente descripción de la invención no debe sustituir la generalidad de la descripción anterior de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Resolución clásica del racemato

Se obtuvo una mezcla racémica del compuesto 1 y el compuesto 3 mediante el método del documento US 5246943 y se sometió a resolución usando formación de sal quirál. Se usaron veinte bases quirales para separar los  
45 enantiómeros como sales quirales a partir de material racémico, que contenía el compuesto 1 y el compuesto 3. El procedimiento de resolución fue proporcionar una sal del enantiómero, el compuesto 1 en una forma sólida cristalizada, a partir de la cual pudo prepararse el ácido libre, el compuesto 1.

Se prepararon todas las bases quirales hasta concentraciones de 0,5 molar en etanol. Las que no se disolvieron en etanol se añadieron como sólidos, usando las masas dadas, de modo que se añadieron 1,05 equivalentes molares de las bases a cada muestra del ácido libre. Se calentaron las disoluciones hasta 50°C con agitación y se enfriaron hasta 5°C a lo largo de veintiuna horas. Los resultados se muestran en la tabla 1. Las muestras 7 y 9 se

recristalizaron con enfriamiento. Las que no se recristalizaron se sonicaron durante diez minutos, y después se almacenaron en un agitador a 25°C durante la noche. Las muestras 4, 6, 12 y 19 se añadieron como sólidos y no se disolvieron completamente a 50°C, de modo que se hicieron madurar a 25°C.

Tabla 1. Resolución inicial de sal quiral

Muestra	Base quiral	Volumen usado de disolución 0,5 M	Masa usada	Sólido
1	L-Arginina	No se disolvió	18,29 mg	-
2	(R)-(+)-N-Bencil- $\alpha$ -metilbencilamina	210 $\mu$ l		-
3	(R)-(-)-2-amino-1-butanol	210 $\mu$ l		-
4	(R)-(-)-Epinefrina	No se disolvió	19,24 mg	√
5	(S)-(+)-2-Amino-3-metil-1-butanol (valinol)	210 $\mu$ l		-
6	(1S,2S)-2-Amino-1-(4-nitrofenil)-1-3-propanodiol	No se disolvió	22,51 mg	√
7	(R)-(-)-amino-2-propanol	210 $\mu$ l		√
8	(-)-Cinchonidina	210 $\mu$ l		-
9	(R)-(-)-1-Ciclohexilamina	210 $\mu$ l		√
10	Deshidroabietilamina	210 $\mu$ l		-
11	(S)-(+)-Leucinol	210 $\mu$ l		-
12	L-Lisina	No se disolvió	15,66 mg	√
13	(R)-(+)- $\alpha$ -Metilbencilamina	210 $\mu$ l		-
14	(1R,2S)-(-)-N-Metilefedrina	210 $\mu$ l		-
15	N-Metil-D-glucamina	No se disolvió	20,70 mg	-
16	(R)-(-)-2-Fenilglicinol	210 $\mu$ l		-
17	(S)-2-Pirrolidinmetanol	210 $\mu$ l		-
18	Quinilina	210 $\mu$ l		-
19	(1R,2S)-(+)-Tiomicamina	No se disolvió	22,62 mg	√
20	N-Etil-D-glucamina	No se disolvió	22,41 mg	-

- 5 Las seis muestras que dieron sólidos se analizaron mediante HPLC quiral para evaluar cualquier resolución quiral del compuesto con la formación de sal y los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis mediante HPLC quiral de sales.

Muestra	4	6	7	9	12	19
Sólido	Impurezas presentes	Impurezas presentes	-0,5	+3,0	0,0	-8,0
Agua de cristalización	0,0	Impurezas presentes	Impurezas presentes	+1,0	+2,0	+40,0

- 10 El material recogido de la muestra 19 a partir del tratamiento con tiomicamina mostró la mayor separación de los enantiómeros. El sólido aislado favoreció el compuesto 1 con respecto al compuesto 3, dando un exceso enantiomérico del 8,0%. Por tanto, el agua de cristalización favoreció el enantiómero, el compuesto 3, dando un exceso enantiomérico del 40%. Se analizó el análisis del % de cada enantiómero en el sólido y el agua de cristalización y se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 – Resultados de HPLC quiral para la sal de tiomicamina.

	% del compuesto 3	Compuesto 1
Sólido de la muestra 19	46	54
Agua de cristalización de la muestra 19	70	30

- 15 También se analizaron mediante XRPD los sólidos recogidos. Cada uno de los sólidos recogidos dio nuevos difractogramas que no coincidieron ni con la forma del ácido libre ni con la base quiral usada para formar la sal.

- 20 Se suspendió la sal de tiomicamina a 25°C durante la noche usando 70 mg en 3 ml de etanol, que después se filtró y se analizó el sólido mediante HPLC quiral, dando un aumento en el exceso enantiomérico, de nuevo a favor del compuesto 1. Esto se repitió usando 10 mg del sólido recuperado en 600  $\mu$ l de etanol, dando un aumento en el exceso enantiomérico del 77,8% del compuesto 1. Una <sup>1</sup>H-RMN tras el primer experimento de suspensión muestra que la tiomicamina permanece intacta después de este procedimiento, dando una sal de tiomicamina 1:1. Los

resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 – Resultados de HPLC quiral de suspensión de la sal de tiomicamina.

	% del compuesto 3	% del compuesto 1	Exceso enantiomérico
Después del primer intento de suspensión	31,9	68,1	-36,2
Después del segundo intento de suspensión	11,1	88,9	-77,8

### Ejemplo 2: Resolución quiral adicional del racemato

5 Se disolvió el compuesto racémico en el disolvente apropiado tal como se expone en la tabla 5, usando 50 mg de ácido libre en 500 µl de disolvente. Las bases quirales que no se disolvieron completamente en disolución se añadieron como sólidos a la disolución de ácido libre, de modo que toda las disoluciones contenían 1,05 equivalentes molares de la base quiral. Se calentaron las disoluciones hasta 50°C con agitación, y después se enfriaron hasta 10°C a lo largo de veinte horas.

10 Las disoluciones que no produjeron un sólido con enfriamiento se colocaron en un sonicador durante cinco minutos y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante la noche. Después de esto, sólo las disoluciones con L-arginina no formaron un sólido, a partir de iso-propanol (IPA) o de acetato de etilo (EtOAc).

Tabla 5 - Segunda resolución de sal quiral.

Muestra	Base quiral	Disolvente	Volumen usado de disolución 0,5 M	Masa usada	Formación de sólido
1	L-Arginina	IPA	210 µl		no se produjo ningún sólido
2	(R)-(-)-2-amino-1-butanol	IPA	210 µl		sólido formado con enfriamiento
3	(R)-(-)-1-amino-2-propanol	IPA	210 µl		sólido formado con enfriamiento
4	(R)-(-)-1-Ciclohexiletilamina	IPA	210 µl		sólido formado con enfriamiento
5	L-Lisina	IPA	No se disolvió	15,66 mg	sólido formado con enfriamiento
6	(R)-(+)-α-Metilbencilamina	IPA	210 µl		sólido después del sonicador
7	N-Metil-D-glucamina	IPA	No se disolvió	20,70 mg	sólido formado con enfriamiento
8	(1R,2S)-(+)-Tiomicamina	IPA	No se disolvió	22,62 mg	sólido formado con enfriamiento
9	N-Etil-D-glucamina	IPA	No se disolvió	22,41 mg	sólido formado con enfriamiento
10	(S)-(+)-2-Amino-1-propanol	IPA	210 µl		sólido formado con enfriamiento
11	L-Arginina	Acetato de etilo	210 µl		no se produjo ningún sólido
12	(R)-(-)-2-amino-1-butanol	Acetato de etilo	210 µl		sólido formado con enfriamiento
13	(R)-(-)-1-amino-1-propanol	Acetato de etilo	210 µl		sólido formado con enfriamiento
14	(R)-(-)-1-Ciclohexiletilamina	Acetato de etilo	210 µl		sólido formado con enfriamiento
15	L-Lisina	Acetato de etilo	No se disolvió	15,66 mg	sólido formado con enfriamiento
16	(R)-(+)-α-Metilbencilamina	Acetato de etilo	210 µl		sólido después del sonicador
17	N-Metil-D-glucamina	Acetato de etilo	No se disolvió	20,70 mg	sólido formado con enfriamiento
18	(1R,2S)-(+)-Tiomicamina	Acetato de etilo	No se disolvió	22,62 mg	sólido formado con enfriamiento
19	N-Etil-D-	Acetato de etilo	No se disolvió	22,41 mg	sólido formado

Muestra	Base quiral	Disolvente	Volumen usado de disolución 0,5 M	Masa usada	Formación de sólido
	glucamina				con enfriamiento
20	(S)-(+)-2-Amino-1-propanol	Acetato de etilo	210 µl		sólido formado con enfriamiento

- Se filtraron los sólidos a vacío y se analizaron mediante HPLC quiral, al igual que las aguas de cristalización recogidas. Los resultados muestran que hay unas pocas bases que pueden usarse para separar los enantiómeros. Sólo una, la tiomicamina, separó los enantiómeros dando un exceso del compuesto 1, el enantiómero deseado, en el sólido. Por tanto, estas bases pueden usarse para separar los enantiómeros, sin embargo, la tiomicamina ha mostrado ser la única base que separa los enantiómeros tanto en etanol como en acetato de etilo de manera eficaz y da el enantiómero deseado.

Metodología para los ejemplos 3 a 15

Difracción de rayos X de polvo (XRPD)

Instrumento D5000 de Siemens

- 10 Se recogieron espectros de XRPD en un difractor AXS de Bruker o D5000 de Siemens.

Se recogieron espectros de difracción de rayos X de polvo en un difractor D5000 de Siemens usando radiación  $K\alpha$  de Cu (40 kV, 40 mA), goniómetro  $\theta$ - $\theta$ , rendijas de recepción y divergencia automáticas, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. Se comprobó el rendimiento del instrumento usando un patrón de corindón certificado (NIST 1976).

- 15 Condiciones ambientales

Se prepararon muestras que se hicieron pasar en condiciones ambientales como ejemplares de placa plana usando polvo tal como se recibió. Se empaquetaron de manera suave aproximadamente 35 mg de la muestra en una cavidad cortada en una oblea de silicio pulida, sin ruido de fondo (510). Durante el análisis se hizo rotar la muestra en su propio plano. Los detalles de la recogida de datos son:

- 20 Rango angular: de 2 a  $42^\circ 2\theta$

Tamaño de escalón:  $0,05^\circ 2\theta$

Tiempo de recogida:  $4s.escalón^{-1}$

Instrumento AXS C2 GADDS de Bruker

- 25 Se recogieron espectros de difracción de rayos X de polvo en un difractor AXS C2 GADDS de Bruker usando radiación  $K\alpha$  de Cu (40 kV, 40 mA), microscopio de vídeo láser de plataforma XYZ automatizado para la colocación de muestras automática y un detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X consiste en un único espejo de múltiples capas Göbel acoplado con un colimador de orificio estenoico de 0,3 mm.

- 30 La divergencia del haz, es decir, el tamaño eficaz del haz de rayos X sobre la muestra, fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de barrido continuo de  $\theta$ - $\theta$  con una distancia de muestra - detector de 20 cm, lo cual da un rango de  $2\theta$  eficaz de  $3,2^\circ - 29,7^\circ$ . Normalmente la muestra se expone al haz de rayos X durante 120 segundos.

Condiciones ambientales

- 35 Se prepararon muestras que se hicieron pasar en condiciones ambientales como ejemplares de placa plana usando polvo tal como se recibió sin molienda. Se prensaron de manera ligera aproximadamente 1-2 mg de la muestra sobre un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

Condiciones no ambientales

Se montaron muestras que se hicieron pasar en condiciones no ambientales sobre una oblea de silicio con compuesto térmicamente conductor. Después se calentó la muestra hasta la temperatura apropiada a aproximadamente  $20^\circ C.min^{-1}$  y posteriormente se mantuvo isotérmicamente durante aproximadamente 1 minuto

antes de iniciarse la recogida de datos.

#### Difracción de rayos X de monocristal (SCXRD)

5 Se recogieron datos en un difractómetro AXS 1K SMART CCD de Bruker equipado con un dispositivo de enfriamiento Cryostream de Oxford Cryosystems. Se resolvieron las estructuras usando los programas o bien SHELXS o bien SHELXD y se refinaron con el programa SHELXL como parte de la serie de AXS SHELXTL Bruker. A menos que se mencione lo contrario, los átomos de hidrógeno unidos a carbono se colocaron geoméricamente y se permitió que se refinaran con un parámetro de desplazamiento isotrópico de movimiento. Los átomos de hidrógeno unidos a un heteroátomo se localizaron en una síntesis de Fourier de diferencia y se permitió que se refinaran libremente con un parámetro de desplazamiento isotrópico.

#### 10 <sup>1</sup>H-RMN

Se recogieron espectros de RMN en un espectrómetro de Bruker 400 MHz equipado con un inyector automático. Se prepararon muestras en d<sub>6</sub>-DMSO, a menos que se mencione lo contrario.

#### <sup>13</sup>C-RMN de estado sólido

15 Se recogieron espectros de RMN en un espectrofotómetro Avance DRX-200 de Bruker. Se hicieron girar las muestras a 5 kHz en una sonda de giro con ángulo mágico SB de Bruker de 4 mm para <sup>13</sup>C-RMN a 50,3 MHz. Se empaquetaron las muestras en rotores de RMN de ZnO de 4 mm y se sellaron con tapones Kell-F. Se aumentó la potencia de transmisión de protones hasta un valor correspondiente a un ancho de pulso a 90° de 2,8 μs para el desacoplamiento de protones durante la adquisición de datos de <sup>13</sup>C. Se calculó el promedio de los transitorios a lo largo de 1 h. Se referenciaron los desplazamientos químicos con respecto a una referencia externa usando resonancia de carbonilo de glicina (176 ppm).

#### Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se recogieron datos de DSC en un instrumento Q1000 de TA Instruments equipado con un inyector automático de 50 posiciones. Se calibró el instrumento en cuanto a la calibración de energía y temperatura usando indio certificado.

25 Normalmente se calentaron 0,5-3 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con orificios, a 10°C.min<sup>-1</sup> desde 25°C hasta 250°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 30 ml.min<sup>-1</sup> sobre la muestra.

#### Análisis termogravimétrico (TGA)

Se recogieron datos de TGA en un instrumento de TGA Q500 de TA Instruments, equipado con un inyector automático de 16 posiciones. Se calibró la temperatura del instrumento usando Alumel certificado.

30 Normalmente se cargaron 5-30 mg de cada muestra sobre un crisol de platino previamente tarado y una bandeja de DSC de aluminio, y se calentaron a 10°C.min<sup>-1</sup> desde la temperatura ambiental hasta 350°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 60 ml.min<sup>-1</sup> sobre la muestra.

#### Sorción gravimétrica de vapor (GVS)

35 Se obtuvieron isothermas de sorción usando un analizador de sorción de humedad IGASorp de Hiden, controlado mediante software CFRSorp. Se mantuvo la temperatura de la muestra a 25°C mediante un baño de agua de recirculación Huber. Se controló la humedad mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con una velocidad de flujo total de 250 ml.min<sup>-1</sup>. Se midió la humedad relativa mediante una sonda de HR de Vaisala calibrada (rango dinámico de HR del 0-95%), ubicada cerca de la muestra. Se monitorizó constantemente el cambio de peso (relajación másica) de la muestra en función del % de HR mediante la microbalanza (precisión de ±0,001 mg).

40 Normalmente se colocaron 10-20 mg de muestra en una cesta de acero inoxidable de malla tarada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y descargó a una HR del 40% y a 25°C (condiciones ambiente típicas).

Se realizó una isoterma de sorción de humedad tal como se expone resumidamente a continuación (2 barridos dando 1 ciclo completo). Se realizó la isoterma de patrón a 25°C a intervalos de HR del 10% a lo largo de un rango de HR del 0-90%. Los parámetros se muestran en la tabla 6:

Tabla 6.

Parámetros	Valores
Adsorción – barrido 1	40-90
Desorción / adsorción – barrido 2	85 - sequedad, sequedad - 40
Intervalos (% de HR)	10
Número de barridos	2
Velocidad de flujo (ml.min <sup>-1</sup> )	250
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C.min <sup>-1</sup> )	0,05
Tiempo mínimo de sorción (horas)	1
Tiempo máximo de sorción (horas)	4
Modo	AF2
Precisión (%)	98

5 El software usa un procedimiento de minimización de mínimos cuadrados junto con un modelo de la relajación másica para predecir un valor asintótico. El valor de relajación másica medido debe estar dentro del 5% del predicho por el software, antes de seleccionar el siguiente valor de % de HR. Se fijó el tiempo mínimo de equilibrado a 1 hora y el máximo a 4 horas.

Se recuperó la muestra tras completarse la isoterma y volvió a analizarse mediante XRPD.

Determinación de agua mediante coulombimetría de Karl Fischer (KF)

10 Se midió el contenido en agua de cada muestra en un coulombímetro DL39 de Mettler Toledo usando reactivo Hydranal Coulomat AG y una purga de argón. Se introdujeron muestras sólidas pesadas en el recipiente sobre una bandeja de TGA de platino que se conectó a un septo Subaseal para evitar la entrada de agua. Se usaron aproximadamente 10 mg de muestra por valoración y se realizaron determinaciones por duplicado.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Determinación de la pureza

15 Se realizó un análisis de la pureza con un sistema de la serie HP1100 de Agilent equipado con un detector de red de diodos y usando el software ChemStation v9. Los métodos se muestran en las tablas 7 y 8.

Tabla 7.

Tipo de método	Fase normal		Fase inversa	x
	Isocrático		Gradiente	x
Columna:	Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 4,6 mm, 5 µm			
Temperatura de columna (°C):	25			
Inyección (µl):	10			
Detección: longitud de onda, ancho de banda (nm):	255, ancho de banda de 90 nm			
Velocidad de flujo (ml.min <sup>-1</sup> ):	1,0			
Fase A:	TFA al 0,1% en agua			
Fase B:	TFA al 0,085% en acetonitrilo			
Programa:	Tiempo (min)		% de fase A	% de fase B
	0		95	5
	25		5	95
	25,2		95	5
	30		95	5

Tabla 8. Análisis quiral

Tipo de método	Fase normal		Fase inversa	x
	Isocrático		Gradiente	x
Columna:	Regis Technologies (S,S)-Whelk-01 10/100 Kromasil FEC 250 x 4,6 mm			
Temperatura de columna (°C):	20			

Tipo de método	Fase normal		Fase inversa	x
	Isocrático		Gradiente	x
Inyección (µl):	10			
Detección:	UV a 220 nm			
Longitud de onda, ancho de banda (nm):				
Velocidad de flujo (ml.min <sup>-1</sup> ):	2,0			
Fase móvil:	n-Hexano:etanol:ácido acético 60:40:0,1			
Disolvente de muestra:	n-Hexano:etanol 60:40			

## Cromatografía iónica

- 5 Se recogieron datos en un instrumento 861 Advanced Compact IC de Metrohm usando el software IC Net v2.3. Se prepararon muestras como disoluciones madre de 1000 ppm en agua. Cuando la solubilidad de la muestra era baja, se usó un disolvente adecuado tal como DMSO. Se diluyeron las muestras hasta 50 ppm o 100 ppm con un disolvente apropiado antes de las pruebas. Se logró la cuantificación mediante comparación con disoluciones patrón de concentración conocida del ion que estaba analizándose. Las condiciones se muestran en las tablas 9A y 9B.

Tabla 9A.

Tipo de método	Intercambio aniónico
Columna:	Metrosep A Supp 5 - 250 (4,0x250 mm)
Temperatura de columna (°C):	Ambiental
Inyección (µl):	20
Detección:	Detector de conductividad
Velocidad de flujo (ml.min <sup>-1</sup> ):	0,7
Eluyente:	Carbonato de sodio 3,2 mM, hidrogenocarbonato de sodio 1,0 mM en agua

Tabla 9B.

Tipo de método	Intercambio catiónico
Columna:	Metrosep C 2 - 250 (4,0x250 mm)
Temperatura de columna (°C):	Ambiental
Inyección (µl):	20
Detección:	Detector de conductividad
Velocidad de flujo (ml.min <sup>-1</sup> ):	1,0
Eluyente:	Ácido tartárico 4,0 mM, ácido dipicolínico 0,75 mM en agua

**Ejemplo 3: Selección de sales**

- 10 Se disolvió compuesto 1 en el disolvente iso-propanol (IPA) o tetrahidrofurano (THF) tal como se menciona en la tabla 10 y se le añadieron 1,05 equivalentes molares de la base farmacéuticamente aceptable. Se prepararon las bases en una disolución uno molar, a menos que la base no se disolviera, en cuyo caso se añadió como un sólido. A todas las disoluciones se les añadieron 1,05 equivalentes molares de la base.

- 15 Se agitaron las disoluciones a 50°C durante dos horas, y después se enfriaron hasta 5°C a lo largo de tres horas y media con agitación continua. Después se almacenaron las muestras a 5°C durante tres días. Se sonicaron las que todavía estaban en disolución durante diez minutos, y después, si eso no produjo ningún sólido, se permitió que se eliminara el disolvente por evaporación lentamente. Se analizaron todos los sólidos recogidos mediante XRPD. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la selección inicial de sales.

Muestra	Base	Disolvente	Conc. y volumen de disolución usados	Masa usada	Enfriamiento hasta 5°C	Sonicado	Evaporado
1	Hidróxido de potasio	IPA	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
2	Hidróxido de sodio	IPA	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma

Muestra	Base	Disolvente	Conc. y volumen de disolución usados	Masa usada	Enfriamiento hasta 5°C	Sonicado	Evaporado
3	L-Arginina	IPA	48,7 µl de 0,5 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
4	Colina	IPA	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
5	Monohidrato de L-lisina	IPA	Añadido como sólido	4,00 mg	Cristalino	-	-
6	Dimetilaminoetanol	IPA	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
7	N-Etilglucamina	IPA	Añadido como sólido	5,09 mg	Amorfo	-	-
8	N-Metilglucamina	IPA	Añadido como sólido	4,75 mg	Amorfo	-	-
9	Trometamina	IPA	Añadido como sólido	2,95 mg	Cristalino	-	-
10	Hidróxido de potasio	THF	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
11	Hidróxido de sodio	THF	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
12	L-Arginina	THF	48,7 µl de 0,5 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
13	Colina	THF	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
14	Monohidrato de L-lisina	THF	Añadido como sólido	4,00 mg	Cristalino	-	-
15	Dimetilaminoetanol	THF	24,3 µl de 1 M		Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
16	N-Etilglucamina	THF	Añadido como sólido	5,09 mg	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
17	N-Metilglucamina	THF	Añadido como sólido	4,75 mg	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
18	Trometamina	THF	Añadido como sólido	2,95 mg	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma

Sólo tres de las muestras dieron algún material cristalino sólido. La sal de lisina a partir de IPA y THF y la sal de trometamina a partir de IPA. El análisis mediante XRPD muestra que todas ellas tienen diferentes patrones cristalinos. El análisis de la pureza química mediante HPLC de las sales de lisina y trometamina muestra una mejora en la pureza con respecto al material de partida, desde el 96,7% hasta el 98,0% para la sal de lisina y el 97,8% para la sal de trometamina.

5

Se mostró que la sal de lisina cristalina era delicuescente a 40°C / HR del 75% y a 25°C / HR del 94%. La sal de trometamina era delicuescente a 25°C / HR del 94%. Como resultado, ninguna de estas sales de amina era adecuada para el desarrollo farmacéutico.

#### Ejemplo 4: Selección adicional de sales

10 Se repitieron los intentos por preparar una sal con potasio o sodio con diferentes disolventes. Se disolvieron 20 mg del compuesto 1 en 20 µl del disolvente apropiado, a lo que se añadieron 1,05 equivalentes molares de hidróxido de potasio o hidróxido de sodio como una disolución uno molar en agua. Se calentaron las disoluciones hasta 50°C durante dos horas y se enfriaron hasta 5°C a lo largo de 21 horas, con agitación en todo momento. Si no se formó ningún sólido después del enfriamiento, se sonicaron las disoluciones, después, si todavía no se formó ningún sólido, se permitió que se evaporara el disolvente para intentar cristalizar la sal.

15

Tabla 11 - Resultados de la formación de sales de potasio/sodio

Muestra	Base	Disolvente	Enfriamiento hasta 5°C	Sonicado	Evaporado
1	Hidróxido de potasio	Acetato de etilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
2	Hidróxido de potasio	Acetonitrilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
3	Hidróxido de potasio	Dioxano	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
4	Hidróxido de potasio	Tolueno	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
5	Hidróxido de potasio	DCM	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma

Muestra	Base	Disolvente	Enfriamiento hasta 5°C	Sonicado	Evaporado
6	Hidróxido de sodio	Acetato de etilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
7	Hidróxido de sodio	Acetonitrilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
8	Hidróxido de sodio	Dioxano	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
9	Hidróxido de sodio	Tolueno	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
10	Hidróxido de sodio	DCM	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma

No hubo ningún disolvente en el que la disolución diera un sólido, sólo se produjeron gomas.

Se usaron las gomas para suspenderse en un nuevo conjunto de disolventes en un intento por generar material cristalino. Se añadieron 100 µl del disolvente a la goma y se puso para su maduración durante la noche en un ciclo entre 50°C durante cuatro horas, después a temperatura ambiente durante cuatro horas. Se filtró cualquier sólido y se analizó mediante XRPD. Los resultados se muestran en la tabla 12.

5

Tabla 12. Resultados de la suspensión de sales de potasio/sodio.

Muestra	Base	Disolvente	Después de la maduración
1	Hidróxido de potasio	Acetona	Sin sólidos
2	Hidróxido de potasio	IPA	Sin sólidos
3	Hidróxido de potasio	THF	Sin sólidos
4	Hidróxido de potasio	Etanol	Sin sólidos
5	Hidróxido de sodio	Acetona	Sin sólidos
6	Hidróxido de sodio	IPA	Sólido cristalino
7	Hidróxido de sodio	THF	Sin sólidos
8	Hidróxido de sodio	Etanol	Sólido cristalino

Los sólidos a partir de IPA y etanol dieron nuevos patrones cristalinos a partir del análisis mediante XRPD. Los picos de XRPD y sus intensidades se muestran en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Picos de XRPD para el compuesto 4.

Ángulo 2θ	% de intensidad
5,5	40,1
6,7	9,9
8,0	100,0
8,7	42,4
9,3	35,7
11,1	6,2
13,4	79,4
14,3	14,6
14,7	7,8
15,8	11,7
16,1	20,0
16,6	11,7
17,4	48,5
17,8	17,2
18,8	35,7
20,3	16,9
20,9	20,1
21,4	24,9
22,2	27,0
22,8	23,5
24,2	22,7
25,4	22,9
26,9	15,8
27,6	9,5
28,7	10,0
29,7	17,6
30,3	13,1
31,3	12,3
32,1	12,4
33,5	10,7
35,7	16,8

Ángulo 2θ	% de intensidad
41,0	12,8

Tabla 14. Picos de XRPD para el compuesto 5.

Ángulo 2θ	% de intensidad
5,4	38,1
6,6	12,0
7,9	100,0
8,6	40,6
9,2	25,1
10,8	13,8
13,4	68,0
14,0	20,0
15,9	42,1
16,4	25,9
17,3	70,1
17,6	48,7
18,6	93,5
20,0	78,1
20,5	63,1
21,1	53,8
21,9	94,2
22,5	53,6
23,0	35,9
24,0	57,7
25,0	81,2
25,5	38,8
26,0	39,1
26,6	53,4
27,2	27,1
28,3	20,6
29,3	21,5

5 El análisis mediante cromatografía iónica mostró que el sólido contenía un mol de sodio. La <sup>1</sup>H-RMN confirmó la presencia de disolvente y el análisis mediante HPLC quiral muestra que no se había producido degradación significativa y que todavía era el enantiómero puro, el compuesto 1. Cuando se analizó mediante XRPD a temperatura variable, la estructura cristalina se descompuso después de calentarse por encima de 135°C. Todos los intentos de preparar la sal de sodio en IPA y etanol mediante enfriamiento lento, siembra, evaporación del disolvente y maduración fracasaron. Se colocaron los solvatos de sal de sodio a 40°C/ HR del 75% durante una semana, lo cual dio un nuevo perfil de XRPD, identificado como trihidrato mediante una pérdida de peso del 10% en el TGA, lo cual es igual a tres moles de agua, y la eliminación del disolvente, o bien etanol o bien IPA.

#### 10 Ejemplo 5: Estudios de la sal de sodio

En un intento por formar directamente el solvato de etanol de sal de sodio, el compuesto 4, sin cristalización a partir de una goma, se preparó la sal usando etóxido de sodio en etanol en lugar de usar hidróxido de sodio en agua. Se pensó que la presencia de agua en la preparación inicial podía haber impedido la cristalización.

15 Se disolvieron 25 mg del compuesto 1 en 50 µl de etanol a temperatura ambiente. 18,4 ml, 1,0 equivalente, de etóxido de sodio (al 21% en etanol). El material sólido cristalizó rápidamente al dejarse en reposo a temperatura ambiente. Se filtró la muestra a vacío y se secó a 25°C a vacío durante un día. El análisis mediante XRPD y TGA muestra que el material producido es el mono-solvato de etanol (el compuesto 4). Se almacenó este material a 40°C/HR del 75% durante la noche formando el hidrato (el compuesto 6), para su análisis adicional.

20 Se identificó de nuevo el hidrato, el compuesto 6, mediante XRPD. Los picos de XRPD y sus intensidades se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Picos de XRPD para el compuesto 6.

Ángulo 2θ	% de intensidad
4,8	95,1
5,5	14,4
7,3	29,5

Ángulo 2 $\theta$	% de intensidad
8,3	21,3
9,9	35,4
12,0	43,3
12,6	44,1
15,2	63,7
16,7	100
17,2	92,6
17,9	61,3
19,0	76,8
21,5	62,3
23,5	66,4
24,5	66,1

Cuando se analizó mediante XRPD a temperatura variable, el material perdió cristalinidad al calentarse por encima de 70°C.

5 El análisis mediante GVS del compuesto 6 mostró que el material perdía algo de peso, el 2%, antes de comenzar el análisis, cuando se almacenaba a una HR del 40%. El peso aumentó gradualmente hasta +6% en peso cuando se llevó a una HR del 90%, después volvió a perderlo cuando se llevó a una HR del 0% alcanzando -12% en peso. Al volver a una HR del 40%, el material alcanzó -6% en peso. Se repitió este ciclo de aumento gradual del peso hasta +6% mediante una HR del 90%, después disminución hasta -12% a una HR del 0% y terminando a -6% en peso a una HR del 40%. No hubo mesetas en las que el peso era estable a un rango de humedades. El espectro de GVS sugiere que es posible que el agua pueda entrar o salir de la red cristalina dependiendo de la humedad relativa de la atmósfera alrededor de la misma, dando un contenido en agua en porcentaje para la humedad relativa específica de la atmósfera en la que está contenido el material. Por tanto, si la humedad es mayor, a una HR del 75%, se formó el compuesto 6, sin embargo, cuando la humedad es menor, a una HR del 40%, se formó el compuesto 7. La estimación de un dihidrato cuando se retiró del GVS a una HR del 40% está respaldada por el termograma de TGA que da una pérdida de peso del 6,6%, lo cual es igual a dos moles de agua. El perfil de XRPD después del análisis mediante GVS coincidió con el perfil del material antes del análisis mediante GVS, de modo que la transferencia de agua entre el cristal y la atmósfera no alteró la estructura cristalina.

20 Una muestra del compuesto 6 retirada de 40°C / HR del 75% se secó a 40°C, sin vacío, durante cuatro días. Este material dio el mismo perfil de XRPD después del secado, pero cuando se analizó mediante TGA, el material mostró una pérdida de peso del 6,6%, dando de nuevo el dihidrato, el compuesto 7. Esto respalda el GVS ya que el material se almacenó a 40°C, pero todavía estaba a la humedad relativa ambiental del 40%. Cuatro moles de agua son el 12,3% en peso, tres moles son el 9,25% y dos moles son el 6,2%. Los picos y las intensidades de XRPD para el compuesto 7 se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Picos de XRPD para el compuesto 7.

Ángulo 2 $\theta$	% de intensidad
4,8	100,0
5,5	17,5
7,3	23,7
8,2	16,9
12,1	71,4
12,8	25,3
15,8	75,1
16,9	95,0
18,2	86,2
19,3	84,8
25,6	61,7

25 Un análisis mediante DSC-TGA posterior del compuesto 6 dio una pérdida de peso del 13% lo que sugiere que el compuesto 6 puede tener 4 moléculas de agua o 4 o más moléculas de agua fraccionarias. Un análisis mediante DSC-TGA posterior del compuesto 7 dio una pérdida de peso del 5,5% lo que sugiere que el compuesto 7 puede ser un hidrato fraccionario con menos de 2 moléculas de agua. En estos estudios mediante DSC-TGA posteriores, los datos se obtuvieron en un instrumento SDT Q600 comenzando a la temperatura ambiental y aumentando hasta aproximadamente 300°C a 10°C por minuto.

### 30 Ejemplo 6: Hidratos de sal de sodio

Se preparó el hidrato de sal de sodio únicamente mediante exposición a altas humedades, de modo que se

configuró una serie de experimentos para convertir los solvatos de sal de sodio en el hidrato por medio de cristalización del hidrato a partir de una disolución.

5 Se suspendieron los solvatos de IPA y etanol de la sal en agua, usando 25 mg de la sal en 100 µl de agua, se suspendieron a 25°C, lo cual hizo recrystalizar un material que dio un nuevo perfil mediante XRPD con una pureza química del 99,1% cuando se analizó mediante HPLC. El análisis mediante TGA mostró una pérdida de peso del 25%, que comenzó a perder peso inmediatamente cuando se comenzó el calentamiento. La cromatografía iónica mostró que la nueva forma cristalina era una hemi-sal de sodio. Este material es menos favorable que el hidrato anterior observado, de modo que se continuaron realizando esfuerzos por formar el hidrato anterior mediante suspensión. Los picos y las intensidades de XRPD para el hidrato de hemi-sal de sodio se muestran en la tabla 17.

10 Tabla 17. Picos de XRPD para el hidrato de hemi-sal de sodio

Ángulo 2θ	% de intensidad
6,2	9,2
7,8	15,6
8,7	13,6
10,1	26,0
12,1	21,8
12,7	22,8
13,7	24,8
15,6	43,4
16,1	28,9
16,9	27,2
18,5	44,9
19,8	48,3
20,9	60,5
21,3	50,7
22,4	62,6
23,4	69,5
24,4	100,0
25,1	79,6
25,5	69,0
26,3	75,3

Se usó el solvato de etanol de la sal de sodio para intentar formar el hidrato mediante suspensión en etanol o IPA con proporciones variables de agua.

15 Los precipitados formados a partir de suspensiones en disoluciones en agua al 75% dieron el mismo perfil de XRPD que el material que se suspendió en agua al 100%, dando la hemi-sal de sodio. Una muestra dio un nuevo espectro de XRPD cristalino y se suspendió en agua al 10% en etanol. Se envió esta muestra para su análisis de monocristal, lo cual demostró que el material era el mono-etanolato de hemi-sal de sodio.

20 Se realizó otro intento por formar la sal de sodio hidratada a partir del solvato de etanol de la sal de sodio. Se pesaron 25 mg del solvato de etanol de sal de sodio, el compuesto 4, en cada vial, al que se añadió el disolvente apropiado que contenía agua al 1%. Se añadió el disolvente en 10 µl cada vez para garantizar que el material producía una suspensión, antes de colocarse en la cámara de maduración, sometiénolo a ciclos de cuatro horas a 50°C y cuatro horas a temperatura ambiente. Se sembraron las muestras con la sal de sodio hidratada anteriormente formada. Si no se formó ningún sólido cuando se recuperó de la cámara de maduración, se almacenaron a 5°C para fomentar la cristalización. Si no había ningún sólido tras tres días a 5°C, se añadió gota a gota el antidisolvente, heptano, y volvieron a colocarse las disoluciones en la cámara de maduración. Los resultados se muestran en la tabla 18.

25 Tabla 18. Resultados de suspensión en disoluciones acuosas al 1%.

Muestra	Disolvente	Volumen de disolvente usado	Después de la maduración	Almacenado a 5°C	Antidisolvente añadido
1	Acetona	30 µl	Sin sólidos	Sin sólidos	Sólido cristalino que corresponde con el solvato de etanol
2	THF	30 µl	Sin sólidos	Sin sólidos	Sólido cristalino que corresponde con el solvato de etanol
3	Acetonitrilo	30 µl	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma

Muestra	Disolvente	Volumen de disolvente usado	Después de la maduración	Almacenado a 5°C	Antidisolvente añadido
4	MIBK	30 µl	Goma	n/a	n/a
5	MEK	30 µl	Sólido cristalino que corresponde con el solvato de MEK	n/a	n/a
6	Acetato de etilo	40 µl	Sólido cristalino que corresponde con el solvato de etanol	n/a	n/a
7	Dioxano	70 µl	Sin sólidos	Sólido cristalino que no es el hidrato	n/a

Se filtró el material recogido y se analizó mediante XRPD. La muestra a partir de metil etil cetona (MEK) dio un difractograma no visto anteriormente y por tanto era probablemente el solvato de MEK. La muestra a partir de acetato de etilo, THF y acetona dio el espectro de difractograma de XRPD que correspondía con el material de partida de solvato de etanol. El material recogido a partir de dioxano dio un nuevo perfil, no visto anteriormente, por tanto es probable que sea un solvato de dioxano. Las dos muestras restantes sólo dieron gomas.

#### Ejemplo 7: Polimorfismo de la mono-sal de sodio (el compuesto 2)

Se añadieron aproximadamente 30 mg de la sal de sodio de mono-etanolato (el compuesto 4) a cada uno de quince viales. Se añadieron 200 µl del disolvente apropiado, constatando la solubilidad a temperatura ambiente. Si el material se disolvía completamente, se puso a 5°C, si no se disolvía completamente, se puso a 50°C. Entonces se almacenaron todos los viales a 5°C durante 16 horas. Se analizaron las disoluciones que dieron un sólido mediante XRPD, se permitió que se evaporasen lentamente las que permanecieron en disolución en condiciones ambientales. Los resultados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados del examen de polimorfismos.

Exp. n.º	Disolvente	Contenido en agua añadido	Peso (mg)	Solubilidad a 25°C en 200 µl	Solubilidad a 50°C	Solubilidad a 5°C después de 16 h	Después de evaporación
1	Acetona	10%	30	√	n/a	disolución	
2	Etanol	10%	33	√	n/a	disolución	
3	THF	10%	33	√	n/a	disolución	
4	MeCN	10%	34	√	n/a	disolución	
5	MEK	10%	30	√	n/a	disolución	
6	1-Propanol	10%	33	√	n/a	disolución	
7	EtOAc	10%	31	√	n/a	precipitado	n/a
8	Acetona	-	32	√	n/a	disolución	goma
9	THF	-	34	√	n/a	disolución	goma
10	MeCN	-	33	√	n/a	disolución	precipitado
11	MEK	-	32	√	n/a	precipitado	n/a
12	1-Propanol	-	33	x (suspensión)	x (suspensión)	precipitado	n/a
13	EtOAc	-	34	x (suspensión)	√	precipitado	n/a
14	TBME	-	32	x (suspensión)	x (suspensión)	precipitado	n/a
15	Heptano	-	34	x (suspensión)	x (suspensión)	precipitado	n/a

Siete de las muestras, las muestras 7, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, dieron un sólido, que se analizaron mediante XRPD. Los difractogramas de XRPD de estas siete muestras dieron tres nuevos espectros a partir de acetonitrilo, MEK y EtOAc al 100%, que tenían un espectro que correspondía con el de la muestra a partir de terc-butil metil cetona (TBME). Las muestras a partir de heptano y 1-propanol dieron el mismo espectro que el solvato de etanol y la muestra a partir de agua al 10% en EtOAc dio el mismo espectro que la hemi-sal de sodio. Se secaron las muestras 10, 11, 13 y 14 a 25°C a vacío durante una hora, después se analizaron mediante <sup>1</sup>H-RMN, que mostró que la muestra 10 conservaba una cantidad mínima de disolvente lo que indica que era una forma cristalina no solvatada de la sal de sodio. Se investigó adicionalmente esta muestra, analizándose mediante GVS, TGA, DSC y almacenándose las cuatro de estas muestras a 40°C / HR del 75%, seguido por análisis mediante XRPD adicional. Los picos y las intensidades de XRPD para la sal de sodio no solvatada (el compuesto 2) se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Picos de XRPD para el compuesto 2.

Ángulo (2-theta)	% de intensidad
5,5	49,1
6,0	18,6
6,9	7,4
8,5	10,0
9,6	34,0
11,0	57,7
13,3	38,9
14,0	16,2
16,1	18,7
16,7	35,8
17,9	28,1
18,4	57,1
19,6	29,3
20,6	100,0
21,8	29,4
22,3	39,1
23,3	27,1
23,9	23,3

El material a partir de acetonitrilo (MeCN) mostró una pérdida de peso del 3,5% en el TGA, que se perdió gradualmente hasta aproximadamente 120°C, cuando el peso se perdió más rápidamente, coincidiendo con una endoterma observada a partir de la DSC que representa la fusión de la forma cristalina. El análisis mediante GVS 5 mostró un aumento en el peso de aproximadamente el 17% desde una HR del 40% hasta una HR del 90%, que después disminuyó hasta un peso del -2% a una HR del 0%, disminuyendo un total del 19% en peso. El peso aumentó el 6% a una HR del 40%, correspondiendo con el aumento de peso observado a partir del hidrato, sin volver al peso del material según se introdujo. El ciclo repetido se correspondió con el del ciclo del hidrato y el difractograma de XRPD del material tras el análisis mediante GVS mostró que era la forma hidratada de la sal. Esto 10 también se observó mediante el difractograma de XRPD de las otras tres muestras después de almacenarse a una HR del 40 / 75%.

#### Ejemplo 8: Sal de potasio del compuesto 1

El procedimiento para formar la sal de sodio, usando etóxido de sodio, se repitió usando etóxido de potasio. Se disolvieron 25 mg del ácido libre amorfo, el compuesto 1, en 50 µl de etanol. Se añadieron 22 µl de etóxido de 15 potasio (al 24% en etanol), un equivalente molar, y se almacenó la disolución en un agitador a 25°C durante tres días. Sin precipitación de ningún sólido, se colocó el vial en un sonicador durante cinco minutos, después se almacenó a 5°C para intentar inducir la cristalización de una sal de potasio. Esto se repitió, usando una gama de disolventes diferentes, para disolver el ácido libre. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la formación de sal de potasio.

Muestra	Disolvente	Almacenamiento en el agitador a 25°C	Sonicación	Almacenado a 5°C	Maduración con antidisolvente
1	Metanol	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Aceite
2	IPA	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
3	THF	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
4	Acetato de etilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
5	Acetonitrilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Aceite
6	Dioxano	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
7	Tolueno	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Amorfo
8	DCM	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
9	Acetona	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
10	Agua	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Aceite

20 Ninguno de los disolventes usados dio un precipitado a lo largo de todos los experimentos. En un intento adicional por intentar conseguir que cristalizara la sal de potasio, se permitió que se evaporase el disolvente lentamente, dando sólo gomas a partir de todas las muestras. Se redisolvieron las gomas en 200 µl del mismo disolvente a 50°C, después se añadió heptano, el antidisolvente, gota a gota para dar cierta cantidad de precipitado, que después se 25 almacenó en una cámara de maduración, sometiéndolo a ciclos entre 50°C durante cuatro horas y temperatura ambiente durante cuatro horas. Se filtraron todas las muestras para dar gomas o aceites, excepto por una muestra a partir de tolueno, que, cuando se analizó mediante XRPD, dio una curva amorfa, pero con pequeños picos dentro de

la misma. A la muestra a partir de tolueno se le añadieron 50 µl de tolueno y se devolvió a la cámara de maduración durante cuatro días adicionales, tiempo tras el cual volvió a analizarse la muestra mediante XRPD, mostrando una ligera mejora de los picos en el difractograma, pero todavía era principalmente amorfa.

5 Para investigar la muestra a partir de tolueno, se repitió la formación de sal a mayor escala. Se disolvieron 50 mg del ácido libre, el compuesto 1, (purificado a través de la sal de sodio) en 400 µl de tolueno, a lo que se añadieron 44 µl de etóxido de potasio (al 24% en peso en etanol). Se añadió heptano gota a gota a la disolución hasta que se observó cierta cantidad de precipitado y se colocó el vial en la cámara de maduración, sometiéndolo a ciclos entre 50°C durante cuatro horas y temperatura ambiente durante cuatro horas. Se filtró el material recogido, pero formó una goma al dejarlo en reposo.

#### 10 Ejemplo 9: Sales de calcio y magnesio del compuesto 1

Se usó la sal de sodio de mono-etanolato del compuesto 2 en un intento por intercambiar el ion de sodio por un ion de calcio o de magnesio. Se disolvieron 50 mg de la sal de sodio en una mezcla de IPA/agua. Se disolvieron 5,47 mg de cloruro de calcio y 4,70 mg de cloruro de magnesio en 11 ml y 9 ml de metanol, respectivamente. Se añadieron cada una de la disolución de cloruro de calcio y la disolución de cloruro de magnesio a una disolución de 15 50 mg de la sal de sodio y se agitaron durante tres horas, después se almacenaron a 5°C durante la noche.

Se colocó la disolución en el evaporador rotatorio para eliminar el disolvente, dejando un sólido. Se añadió agua para eliminar cualquier cantidad de cloruro de sodio que pudiera haber estado presente y se filtró el material.

La muestra de magnesio dio una goma, pero la muestra de calcio dio un sólido amorfo, mediante análisis mediante XRPD. Esto se analizó mediante <sup>1</sup>H-RMN y cromatografía iónica. La <sup>1</sup>H-RMN mostró los mismos picos que los observados anteriormente para el ácido libre. Los resultados de cromatografía iónica muestran que el material contenía únicamente 0,07 equivalentes del ion de calcio en la muestra, lo cual debería haber sido 0,5 si se hubiera formado la sal de calcio. El material amorfo debe haber sido el ácido libre amorfo, el compuesto 1, quedando una cantidad mínima de cloruro de calcio en la muestra como mezcla.

#### Ejemplo 10: Conversión de sal de sodio en ácido libre

25 Se disolvió el compuesto 2 amorfo (5,00 g, 8,59 mmol) en acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl 1 M (30 ml), se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó para dar una espuma amarilla. Se secó esta espuma a alto vacío a 50°C durante 2 horas dando 4,373 g de espuma amarilla (100%). La integración de las señales a δ 1,25, 2,39 y 2,87 en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN sugirió que quedaba acetato de etilo al 2,6% p/p atrapado en la espuma. El análisis mediante HPLC muestra una pureza del 97,1%. La HPLC quiral indica que la muestra tiene un exceso enantiomérico de >98%.

30 m/z (ES) 506,2 [MH<sup>+</sup>, 100%], 507,2 [13C-MH<sup>+</sup>, 40%]; EMAR C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>5</sub> requiere 506,1967, hallado 506,1964. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 2,39 (1H\*, dd, J 16,3, 6,0), 2,87 (1H, dd, J 16,3, 6,2), 3,32 (1H, dd, J 16,2, 4,8), 3,39 (1H\* dd, J 16,2, 2,4), 3,81 (3H\*, s), 3,81 (3H, s), 4,42 (1H, d, J 14,9), 4,49 (1H\*, d, J 17,2), 4,58 (1H, d, J 14,9), 4,82 (2H\*, m), 4,89 (1H, d, J 10,9), 4,95 (2H\*, m), 5,01 (1H, d, J 11,0), 5,15 (1H, 1H\*, m), 5,31 (1H, s), 6,54 (1H, d, J 8,4), 6,70 (1H, d, J 8,4), 6,78 (1H\*, d, J 8,5), 6,84 (1H\*, d, J 8,5), 7,10-7,41 (15H, 15H\*, m). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) 24,9, 25,8\*, 43,3\*, 45,6, 52,4, 54,4\*, 55,5, 55,6\*, 55,9, 60,4\*, 74,8\*, 74,9, 111,2, 111,7\*, 121,4, 122,2\*, 125,3, 125,6, 125,7, 127,0, 127,1, 127,2, 127,2, 127,4, 128,0, 128,2, 128,3, 128,4, 128,5, 128,6, 128,6, 128,6, 128,8, 129,0, 129,1, 129,2, 129,4, 137,4, 137,6\*, 138,3\*, 138,8, 138,9, 139,2\*, 145,0, 151,1\*, 151,8, 171,9\*, 172,5, 175,4, 175,5. [α]<sub>D</sub> +5,1 (DCM, c0,68); IR (cm<sup>-1</sup>, pastilla de KBr), 3439, 3029, 1737, 1621, 1496, 1454, 1275, 1215, 1093, 1050, 895, 803, 747, 700, 632. \* representa el rotámero minoritario.

#### 40 Ejemplo 11: Recristalización del ácido libre

Se añadió el ácido libre (el compuesto 1) formado en el ejemplo 10 a diez viales, 25 mg en cada uno, a los que se añadieron 15 µl del disolvente apropiado y se colocaron en una cámara de maduración sometiéndolos a ciclos de cuatro horas a 50°C y cuatro horas a temperatura ambiente durante tres días. Después de este tiempo, los que no recristalizaron se sonicaron, después, si todavía no se formaba ningún sólido, se almacenaron a 5°C. Los resultados se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Resultados de la recristalización del ácido libre.

Muestra	Disolvente	Suspensión a lo largo de tres días	Sonicación	Almacenado a 5°C	Maduración con antidisolvente
1	Etanol	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
2	IPA	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
3	THF	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma

Muestra	Disolvente	Suspensión a lo largo de tres días	Sonicación	Almacenado a 5°C	Maduración con antidisolvente
4	Acetato de etilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
5	Acetonitrilo	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Aceite
6	Dioxano	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
7	Tolueno	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
8	DCM	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Goma
9	Acetona	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Aceite
10	Agua	Sin sólidos	Sin sólidos	Sin sólidos	Amorfo

5 Ninguna de las disoluciones hizo recristalizar ningún material sólido, de modo que se permitió que se evaporasen los disolventes lentamente, sin embargo, esto sólo dio gomas. Se añadieron 200 µl del mismo disolvente a cada vial y se calentaron hasta 50°C para disolver la goma. Se añadió heptano a la disolución hasta que se observó cierta cantidad de precipitado, después se colocó el vial en la cámara de maduración. Todas las muestras dieron o bien una goma o bien un aceite, excepto por una, a partir de agua, que dio un sólido amorfo cuando se analizó mediante XRPD.

### Ejemplo 12: Intento de recristalización del ácido libre a partir de la sal de sodio

10 En la patente estadounidense n.º 5.246.943 (1992) se describe un procedimiento para preparar una forma amorfa del compuesto 1 a partir de la sal de  $\alpha$ -metilbencilamina que implica a adición de disolución acuosa de bisulfato de potasio a una disolución en metanol de la sal de  $\alpha$ -metilbencilamina del compuesto 1. Se usó esta técnica de preparación de la forma de ácido libre del compuesto 1 mediante precipitación con disolución de bisulfato de potasio en un intento por caracterizar la forma física del ácido libre resultante cuando se aplicó esta técnica a la sal de sodio (el compuesto 2). Se disolvieron 50 mg de la sal de sodio en un volumen mínimo de metanol y se añadió gota a gota una disolución de bisulfato de potasio, en metanol (exceso del 1% de bisulfato de potasio), para precipitar el ácido libre. Se colocó el vial en la cámara de maduración, alternando entre 50°C y temperatura ambiente durante cuatro horas cada una, durante tres días. Se filtró la muestra y el difractograma de XRPD mostró que el material recogido era amorfo; sin embargo, había algunos picos en el difractograma provocados por cierta cantidad del material inorgánico restante.

### Ejemplo 13: Estabilidad del solvato de etanol frente a humedad variable

20 Se colocó una muestra del solvato de etanol a 40°C/HR del 75% durante la noche para formar el trihidrato de la sal de sodio. Se comprobó esta conversión mediante XRPD antes de proceder a usar la forma hidratada. Se prepararon aproximadamente 600 mg.

25 Se dividió el material en seis lotes de 90 mg y se almacenaron a seis temperaturas y humedades diferentes. Se fijaron las humedades almacenando el material en un recipiente encima de una disolución saturada de uno de acetato de potasio, carbonato de potasio o nitrito de sodio almacenados o bien a 40°C o bien a 25°C. Esto da las seis condiciones de temperatura y humedad mencionadas en la tabla 23 a continuación. Se analizó el material mediante XRPD, HPLC y prueba coulombimétrica de Karl Fischer tras uno, siete y catorce días.

Tabla 23. Resultados de la evaluación de la estabilidad frente a la humedad.

Muestra	Disolución saturada	Temp.	Humedad relativa	Un día			Siete días			14 días		
				XRPD	HPLC	Karl Fischer	XRPD	HPLC	Karl Fischer	XRPD	HPLC	Karl Fischer
1	Acetato de potasio	25°C	22%	Ligero cambio en los picos (2)	97,7%	7,6%	Sin cambios con respecto al ant. (2)	96,2%	10,2%	Sin cambios con respecto al ant. (2)	97,6%	9,5%
2	Acetato de potasio	40°C	20%	Ligero cambio en los picos (2)	97,7%	6,7%	Sin cambios con respecto al ant. (2)	97,1%	8,7%	Sin cambios con respecto al ant. (2)	97,8%	8,1%
3	Carbonato de potasio	25°C	43%	Sin cambios (1)	97,9%	13,0%	Sin cambios (1)	97,7%	14,2%	Sin cambios (1)	96,8%	13,5%

Muestra	Disolución saturada	Temp.	Humedad relativa	Un día			Siete días			14 días		
				XRPD	HPLC	Karl Fischer	XRPD	HPLC	Karl Fischer	XRPD	HPLC	Karl Fischer
4	Carbonato de potasio	40°C	42%	Sin cambios (1)	97,3%	10,6%	Ligero cambio en los picos (2)	97,5%	13,1%	Sin cambios con respecto al ant. (2)	97,5%	9,4%
5	Nitrito de sodio	25°C	65%	Sin cambios (1)	97,0%	15,4%	Sin cambios (1)	97,0%	14,1%	Sin cambios (1)		*11,6%, 24,6%
6	Nitrito de sodio	40°C	62%	Sin cambios (1)	97,7%	16,9%	Sin cambios (1)	97,3%	14,8%	Sin cambios (1)		14,9%

\* - El análisis mediante prueba coulombimétrica de Karl Fischer dio un resultado diferente en la segunda serie, por tanto se presentan ambos resultados en lugar de una cifra media.

Se convirtió el material en el hidrato mediante almacenamiento a 40°C / HR del 75%, de modo que los almacenados a la humedad inferior, aproximadamente una HR del 60%, siguieron siendo el mismo material, sin ningún cambio en el difractograma de XRPD, manteniendo un alto valor de contenido en agua en todo momento. El contenido en agua del material almacenado a las humedades bajas, a una HR de aproximadamente el 20%, disminuyó durante la noche, dando un ligero cambio en uno de los picos en el difractograma de XRPD. Un pico a 12 2-theta pasó de ser un pico doble a tener un único pico. Esta diferencia en el difractograma de XRPD resultó evidente en todos los materiales que perdieron contenido en agua. El material almacenado a una HR de aproximadamente el 40% sólo perdió agua cuando se calentó a 40°C a lo largo de una semana. Sin embargo, a 25°C el contenido en agua, y por tanto el difractograma de XRPD, siguió siendo igual a lo largo de la totalidad de las dos semanas. La pureza del material se mantuvo a lo largo de todo el experimento y no parece verse afectada por el almacenamiento a humedades bajas o altas.

#### Ejemplo 14: Solubilidad y estabilidad del compuesto 2

Se evaluó la solubilidad del compuesto 2 en un disolvente, seleccionado de agua, metanol, acetonitrilo (ACN) e isopropanol y en tampón fosfato 50 mM a pH 1, 2, 7 y 8, tampón citrato 50 mM a pH 3, 4, 5 y 6 y en tampón borato 50 mM a pH 9.

Se añadió el compuesto 2 a 10 ml del disolvente o tampón hasta que la disolución se saturó visiblemente y permaneció turbia con el mezclado en vórtex. Se colocó cada muestra en un agitador de vaivén a temperatura ambiente durante 24 horas, después se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45 µm para retirar el exceso de compuesto en suspensión.

Después se diluyeron las muestras cuando se requirió según la tabla 24, y se analizaron mediante HPLC. Se compararon los resultados con una curva patrón de concentraciones conocidas en ACN. Los resultados se muestran en la tabla 25.

Tabla 24. Diluciones madre de muestras para t=0 y t=1 semana.

Muestra	Volumen de disolución madre (ml)	Volumen total de medios seleccionados (ml)
H <sub>2</sub> O	1	50
H <sub>2</sub> O	1	25
MeOH	1	100
ACN	1	25
IPA	1	25
pH 1	N/A	N/A
pH 2	N/A	N/A
pH 3	N/A	N/A
pH 4	N/A	N/A
pH 5	N/A	N/A
pH 6	1	10
pH 7	1	10
pH 8	1	10
pH 9	1	10

Tabla 25. Solubilidad de disolución del compuesto 2

Disolvente	Solubilidad
Tampón de pH 1 (fosfato, 50 mM)	< 1 µg/ml
Tampón de pH 2 (fosfato, 50 mM)	< 1 µg/ml
Tampón de pH 3 (fosfato, 50 mM)	< 1 µg/ml
Tampón de pH 4 (citrato, 50 mM)	< 1 µg/ml
Tampón de pH 5 (citrato, 50 mM)	33 µg/ml
Tampón de pH 6 (citrato, 50 mM)	0,9 mg/ml
Tampón de pH 7 (fosfato, 50 mM)	1,7 mg/ml
Tampón de pH 8 (fosfato, 50 mM)	1,6 mg/ml
Tampón de pH 9 (borato, 50 mM)	5,3 mg/ml
Agua	14 mg/ml
Metanol	> 50 mg/ml
Acetonitrilo	12 mg/ml
IPA	0,7 mg/ml

Se tomaron los análisis anteriores como t=0 y después se dividieron las muestras en dos y se almacenó una de cada muestra a 5°C durante una semana y se almacenó la otra de cada muestra a 25°C/humedad relativa (HR) del 60% durante una semana.

- 5 Tras una semana, se permitió que se equilibrasen las muestras hasta temperatura ambiente y si se requería (muestras de H<sub>2</sub>O y pH 7-9 almacenadas a 5°C) volvieron a filtrarse para retirar el precipitado.

Volvieron a analizarse las muestras mediante HPLC. Los resultados se muestran en las tablas 26 y 27.

Tabla 26. Estabilidad en disolución del compuesto 2 a 25°C/HR del 60%

Muestra	% de pureza		
	% de pureza inicial	% de pureza a t = 1 semana a 25°C/HR del 60%	Δ% de pureza a 25°C/HR del 60%
H <sub>2</sub> O	95,58	95,67	+0,09
MeOH	97,39	97,39	0,00
ACN	97,50	97,46	-0,04
IPA	89,28	90,51	+1,23
pH 1*	-	-	-
pH 2*	-	-	-
pH 3*	-	-	-
pH 4*	-	-	-
pH 5*	-	-	-
pH 6	88,37	88,98	+0,61
pH 7	76,12	76,52	+0,40
pH 8	85,54	86,70	+1,16
pH 9	91,24	91,60	+0,36

\* Debido a la baja solubilidad de las disoluciones a pH 1-5, no pudieron determinarse datos de estabilidad

Tabla 27. Estabilidad en disolución del compuesto 2 a 5°C

Muestra	% de pureza		
	% de pureza inicial	% de pureza a t = 1 semana a 5°C	Δ% de pureza a 5°C
H <sub>2</sub> O	95,58	94,66	-0,92
MeOH	97,39	97,52	+0,13
ACN	97,50	97,50	0,00
IPA	89,28	89,59	+0,31
pH 1*	-	-	-
pH 2*	-	-	-
pH 3*	-	-	-
pH 4*	-	-	-
pH 5*	-	-	-
pH 6	88,37	87,02	-1,35
pH 7	76,12	74,27	-1,85
pH 8	85,54	81,45	-4,09

Muestra	% de pureza		
	% de pureza inicial	% de pureza a t = 1 semana a 5°C	Δ% de pureza a 5°C
pH 9	91,24	89,17	-2,07
* Debido a la baja solubilidad de las disoluciones a pH 1-5, no pudieron determinarse datos de estabilidad			

5 El compuesto 2 ha demostrado solubilidad y estabilidad en disolventes orgánicos y tampones acuosos seleccionados. Para los disolventes examinados, el compuesto 2 era más soluble en MeOH, >50 mg/ml, la menor solubilidad fue en alcohol iso-propílico, 0,7 mg/ml. El perfil de solubilidad en función del pH presentó un aumento de la solubilidad con un aumento del pH. El compuesto 1 tiene un  $pK_a$  de ~3,86 y esto explica la tendencia de la solubilidad en función del pH. Los datos de estabilidad obtenidos para las muestras a pH 1-5 dieron resultados no concluyentes debido a la baja solubilidad del compuesto 2 en estos tampones.

#### Ejemplo 15: Comparación de cápsulas de HPMC y gelatina

10 Se llenaron veinte cápsulas tanto de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, también conocida como hipromelosa) como de gelatina con  $25 \pm 1$  mg del compuesto 2 amorfo para determinar si el menor contenido en agua hallado en cápsulas de HPMC retrasaría la captación de agua por parte del compuesto. Se colocaron muestras del compuesto 2 en ambos tipos de cápsula a 25°C/HR del 60% y a 40°C/HR del 75% durante 1 semana. Se analizaron las muestras para determinar el contenido en agua, la potencia y el % de pureza (% de área) a t=0 y t=1 semana.

#### Preparación de muestras de HPMC y gelatina con compuesto 2

15 Se llenaron manualmente 20 cápsulas de HPMC transparentes de tamaño 00 y 20 cápsulas de gelatina transparentes de tamaño 00 con API.

Cada cápsula se llenó con  $25 \pm 1$  mg de API.

Los dos tipos de cápsula se separaron en dos botellas de HDPE de 30 cc con tapones y se colocaron tanto a 25°C/HR del 60% como a 40°C/HR del 75% durante 1 semana.

#### Análisis de muestras a t=0

20 Para el punto de tiempo t=0, se analizó el compuesto 2 para determinar el contenido en agua, la potencia y el % de pureza (% de área).

#### Contenido en agua

25 Se tomaron dos muestras del compuesto 2 a t=0 para determinar el contenido en agua. La primera muestra se tomó tras haberse llenado las cápsulas de HPMC y la segunda muestra se tomó tras haberse llenado las cápsulas de gelatina. Este procedimiento de toma de muestras se realizó para compensar la captación de agua que tuvo lugar mientras estaban llenándose las cápsulas.

Se pesaron 50,3 mg del compuesto 2 en un vial para engarzado tras haberse llenado las cápsulas de HPMC.

Se engarzó inmediatamente el vial para el análisis de Karl Fischer.

Se pesaron 50,4 mg del compuesto 2 en un vial para engarzado tras haberse llenado las cápsulas de gelatina.

30 Se engarzó inmediatamente el vial para el análisis de Karl Fischer.

#### Potencia y % de pureza (% de área)

Se pesaron 76,17 mg del compuesto 2 directamente en un matraz aforado de 100 ml.

Se enrasó el matraz con ACN y se le dio la vuelta para mezclarlo.

Se transfirió una alícuota de 1 ml directamente a un vial para HPLC para su análisis.

35 Se almacenaron las muestras a 40°C/HR del 75% y 20°C/HR del 60% durante 1 semana y después se analizaron las muestras mediante HPLC para determinar el % de pureza y el % de potencia. Los resultados se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Resultados de potencia y pureza de HPMC frente a gelatina para t=0 y t=1 semana

Nombre	% de potencia	% de pureza a/a	Δ% de pureza a/a
Muestra t=0	86,3	98,95	N/A
Cápsulas de HPMC, 25°C, t=1 semana	90,2	98,95	0,00
Cápsulas de HPMC, 40°C, t=1 semana	89,8	98,74	-0,21
Cápsulas de gelatina, 25°C, t=1 semana	90,1	98,95	0,00
Cápsulas de gelatina, 40°C, t=1 semana	90,8	98,88	-0,07

5 Se implementó la comparación de cápsulas de HPMC frente a gelatina para determinar si el menor contenido en agua de partida de las cápsulas de HPMC dificultaba la absorción de agua por parte del compuesto 2. También se realizó este experimento para determinar si un aumento en el contenido en agua conducía a una disminución en la potencia y el % de pureza (% de área) del compuesto. Los resultados mostraron que las cápsulas de HPMC sí ralentizaban de hecho la captación de agua, con respecto a la gelatina, en un 3,74% cuando se almacenaban a 40°C/HR del 75%. La potencia y el % de pureza (% de área) del compuesto 2 no cambiaron para todas las condiciones sometidas a prueba después de 1 semana.

10 **Ejemplo 16: Distribución de tamaño de partícula, flujo de polvo, densidad aparente, densidad de compactación y viabilidad de la molienda del compuesto 2**

Se determinó la distribución de tamaño de partícula del compuesto 2 mediante análisis de granulometría con tamiz. Se hizo pasar una muestra del compuesto 2 a través de una serie de tamices, que incluían una criba de 53, 106, 250, 500, 710 y 1000 μm de malla. Se pesó cada criba antes y después de producirse el tamizado para determinar la cantidad de compuesto a cada tamaño de partícula.

15 Se determinó el flujo de polvo con un aparato FlowDex.

20 Se determinó la densidad aparente llenando una probeta graduada de 100 ml tarada con el compuesto 2. Se registraron el volumen y el peso del compuesto 2 añadido y se usaron para calcular su densidad aparente. Después se determinó la densidad de compactación tomando la misma probeta graduada llena con el compuesto 2 y colocándola en un conjunto Autotap durante 100 ciclos. Se registró el nuevo volumen de polvo y se usó para calcular la densidad de compactación.

25 Se pesaron 24,73 mg del compuesto 2 directamente en un matraz aforado de 25 ml tarado. Se enrasó el matraz con ACN y se le dio la vuelta para mezclarlo. Se tomó una muestra para determinar el % de pureza (% de área) del fármaco antes de que tuviera lugar la molienda. Se realizó la molienda tomando 17,92 g del compuesto 2 y haciendo pasar este material a través de un molino cónico con una criba de 1143 μm. Se recuperaron 14,33 g del compuesto 2 y volvieron a analizarse para determinar la distribución de tamaño de partícula, densidad aparente y densidad de compactación. Se pesaron 24,93 mg del compuesto 2 molido directamente en un matraz aforado de 25 ml tarado. Se enrasó el matraz con ACN y se le dio la vuelta para mezclarlo. Se tomó esta muestra para determinar el % de pureza (% de área) tras haberse molido el compuesto 2. Los resultados se muestran en las tablas 29, 30, 31 y 32.

Tabla 29. Distribución de tamaño de partícula del compuesto 2 a granel

Tamaño de tamiz (μm)	Peso del compuesto 2 (mg)	% de peso	% de tamaño inferior
1000	1680,7	30,9	69,1
710	1355,2	24,9	44,2
500	1371,4	25,2	19,0
250	934,0	17,2	1,8
106	82,1	1,5	0,3
53	10,8	0,2	0,1
<53	3,0	0,1	0,0
Peso total	5437,2		

30 Tabla 30. Distribución de tamaño de partícula del compuesto 2 molido (usando una criba de 1143 μm)

Tamaño de tamiz (μm)	Peso del compuesto 2 (mg)	% de peso	% de tamaño inferior
1000	36,4	0,7	99,5
710	1258,8	23,5	76,0
500	1988,9	37,1	38,9
250	1691,5	31,6	7,3

Tamaño de tamiz ( $\mu\text{m}$ )	Peso del compuesto 2 (mg)	% de peso	% de tamaño inferior
106	335,8	6,3	1,0
53	40,9	0,8	0,2
<53	8,2	0,2	0,0
Peso total	5360,5		

Tabla 31. Densidad aparente y de compactación del compuesto 2 sin moler

Peso del compuesto 2	8,86 g
Volumen aparente	100 ml
Volumen de compactación	78 ml
Densidad aparente	0,089 g/ml
Densidad de compactación	0,114 g/ml

Tabla 32. Densidad aparente y de compactación del compuesto 2 molido

Peso del compuesto 2	7,27 g
Volumen aparente	100 ml
Volumen de compactación	74 ml
Densidad aparente	0,073 g/ml
Densidad de compactación	0,098 g/ml

El % de pureza de la muestra del compuesto 2 no cambió con la molienda.

5 Tras haberse molido el compuesto 2, se mezcló con el 2,5% p/p de dióxido de silicio coloidal, Cab-O-Sil®, en una mezcladora T2 Turbula durante 2 minutos. Se recogió el polvo mezclado y se analizaron sus propiedades de flujo en un aparato FlowDex.

10 Se determinó el flujo de polvo del compuesto 2 en un instrumento FlowDex. La primera condición sometida a prueba fue el compuesto 2 a granel sin moler. El polvo no pudo pasar a través del orificio más grande disponible, de 34 mm. La segunda condición sometida a prueba fue el compuesto 2 molido que se había mezclado con el 2,5% p/p de dióxido de silicio coloidal. El flujo del compuesto 2 molido y mezclado pasó a través de un orificio de 34 mm pero no logró pasar a través de un orificio de 32 mm.

Debido a la baja densidad y a la gran distribución de tamaño de partícula del compuesto 2 a granel, se usó un procedimiento de molienda.

15 El procedimiento de molienda redujo el tamaño de partícula promedio del compuesto 2 desde  $\sim 775 \mu\text{m}$  hasta  $\sim 560 \mu\text{m}$  sin degradar el fármaco. Sin embargo, la molienda del compuesto sí que aireó el compuesto provocando una disminución en la densidad aparente y de compactación.

### Ejemplo 17: Comparación de disoluciones

Se analizaron disoluciones de tres formas de sal de sodio sólida, un trihidrato de monosodio (el compuesto 6), un dihidrato de monosal de sodio (el compuesto 7) y el compuesto 2 amorfo.

#### 20 Preparación de cápsulas de trihidrato cristalino (el compuesto 6)

25 Se preparó el material cristalino exponiendo el compuesto 2 amorfo a temperatura ambiental/HR del 75% durante 24 h. Se crearon estas condiciones usando una disolución saturada de cloruro de sodio sellada en una cámara con desecante. Una vez que se hubo creado el material cristalino, se recogió y se almacenó a 2-8°C hasta que tuvieron lugar las pruebas de disolución. Se prepararon dos muestras para disolución pesando  $25 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$  en cápsulas de gelatina opacas blancas de tamaño 00.

#### Preparación de cápsulas de dihidrato cristalino (el compuesto 7)

30 Se preparó el compuesto 7 cristalino, el dihidrato, colocando una muestra del solvato de iso-propanol del compuesto 2 en condiciones de temperatura y humedad ambientales durante 2 semanas. El solvato de iso-propanol del compuesto 2 se convierte fácilmente en el dihidrato. Una vez que se hubo preparado el compuesto 7, se recogió y se almacenó a 2-8°C hasta que se realizaron las pruebas de disolución. Se prepararon dos muestras para disolución pesando  $25 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$  en cápsulas de gelatina opacas de tamaño 00.

Preparación de cápsulas del compuesto 2

Se prepararon dos muestras para disolución pesando  $25 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$  del compuesto 2 amorfo en cápsulas de gelatina opacas blancas de tamaño 00.

- 5 Los materiales y parámetros de disolución se exponen en la tabla 33. En cada tiempo de extracción se retiraron ~6 ml de medios de cada recipiente y se filtraron a través de un filtro de nailon de  $0,45 \mu\text{m}$ . Se desecharon los primeros 5 ml de disolución y se recogió el 1 ml final en un vial para UPLC para su análisis.

Tabla 33. Parámetros y materiales de disolución.

Medios de disolución	Tampón fosfato pH 6,8
Volumen de medios de disolución por recipiente	900 ml
Temperatura del baño	$37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$
Velocidad de paletas	50 rpm durante la 1ª hora, 150 rpm durante la 2ª hora
Tiempos de extracción	15, 30, 45, 60 y 120 minutos

Se evaluaron los valores de disolución medios en cada punto de tiempo para cada muestra y se proporcionan en la tabla 34.

- 10 Tabla 34. Resultados de disolución para diferentes formas cristalinas del compuesto 2

Tiempo (min)	% de disolución del compuesto 7	% de disolución del compuesto 6	% de disolución del compuesto 2
15	72,8	39,4	77,8
30	74,7	56,5	83,6
45	77,4	64,4	86,3
60	78,2	69,6	88,8
120	80,9	88,9	92,9

Tal como se esperaba, las formas cristalinas del compuesto 2 tenían la velocidad de disolución más lenta, mientras que el compuesto 2 amorfo se disolvió de manera considerablemente más rápida.

**Ejemplo 18: Formulación**

- 15 Se mezclaron los componentes expuestos en la tabla 35 para proporcionar una mezcla homogénea y se colocó la mezcla en cápsulas de gelatina o HMPC.

Tabla 35. Formulaciones prototipo del compuesto 2 amorfo

Componente	Calidad	Formulación de 25 mg	Formulación de 10 mg	Formulación de 25 mg	Formulación de 25 mg
Compuesto 2	N/A	6,49%	6,49%	6,49%	5,06%
Dióxido de silicio coloidal	Aerosil 200 Pharma (USP/NF, EP, JP)	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
Celulosa microcristalina (MCC)	Avicel PH102 (USP/NF, EP, JP)	92,01%	92,01%	92,01%	-
Manitol	Fast-Flo (USP/NF, EP, JP)	-	-	-	93,44%
Estearato de magnesio	Calidad vegetal (USP/NF, EP, JP)	1,0%	1,0%	1,0%	-
Ácido esteárico	Hystyrene (USP/NF, EP, JP)	-	-	-	1,0%
	Total	100%	100%	100%	100%
Tipo de cubierta de cápsula		HPMC (VCaps Plus)	HPMC (VCaps Plus)	Gelatina (Coni-Snap)	HPMC (VCaps Plus)
Peso de relleno de cápsula		440 mg	176 mg	440 mg	565 mg
Tamaño de cápsula		00	2	00	00

La estabilidad de formulaciones de 25 mg seleccionadas se muestra a un mes a 40°C / HR del 75°C en la tabla 36.

Tabla 36. Estabilidad.

Aspecto	HMPC / Manitol		HPMC/MCC		Gelatina / MCC	
	inicial	un mes	inicial	un mes	inicial	un mes
Aspecto	cápsula 00 opaca blanca polvo blanco / blanquecino	sin cambios	cápsula 00 opaca blanca polvo blanco / blanquecino	sin cambios	cápsula 00 opaca blanca polvo blanco / blanquecino	sin cambios
Ensayo	100,1%	95,4%	98,0%	95,4%	97,4%	96,8%
Sustancias relacionadas	0,20%	1,26%	0,27%	0,7%	0,24%	0,57%
Contenido en agua	1,13%	1,56%	5,52%	5,92%	6,53%	7,13%

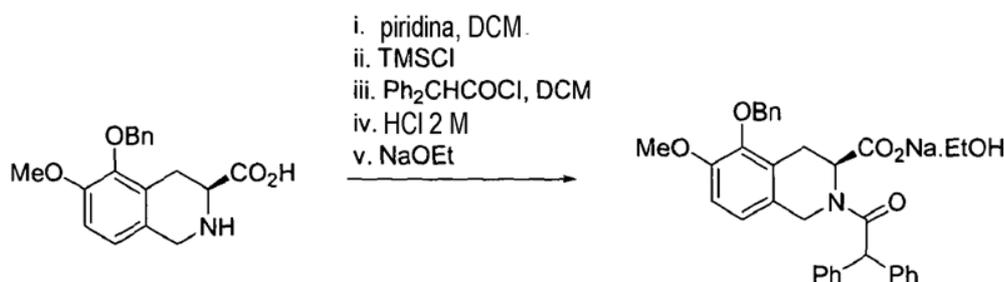
### Ejemplo 19: Preparación del compuesto 2 a partir del ácido libre, el compuesto 1

5 Se disolvió el compuesto 1 (31,35 g, 61,8 mmol, pureza del 95,82%) en diclorometano (DCM) (150 ml) y se trató con disolución de etóxido de sodio (20,05 ml, al 21% p/p). Se evaporó la mezcla hasta sequedad y luego se disolvió en acetato de etilo (110 ml). A esta disolución se le añadió iso-propanol (315 ml) gota a gota con agitación provocando una rápida cristalización. Veinte minutos después de completarse la adición de iso-propanol, se filtraron los cristales, se lavaron con iso-propanol (80 ml) y se secaron sobre el material sinterizado durante aproximadamente 3 h. Esto dio 28,71 g de crema en polvo. Se disolvió este material en 290 ml de agua destilada con calentamiento (40°C) y se agitó a la temperatura ambiental durante 1 h con cristalización resultante. Se secó la mezcla y se secó el residuo a vacío dando 21,35 g (65%) de sólido blanco. El análisis de HPLC reveló el material tenía un e.e. > 98% y una pureza del 99,3%.

15 m/z (ES-) 506,2 [MH<sup>+</sup>, 100%], 507,2 [13C<sub>1</sub>-MH<sup>+</sup>, 40%]; EMAR C<sub>32</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub> requiere 506,1969, hallado 506,1967; <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 2,08 (1H\*, dd, J 16,6, 6,4), 2,83 (1H, dd, J 15,9, 6,4), 3,03 (1H, dd, J 15,9, 6,4), 3,36 (1H\*, m), 3,55 (3H\*, s), 3,66 (3H, s), 4,29-4,47 (3H, 2H\*, m), 4,68 (1H\*, d, J 11,0, 4,83 (2H, m), 4,83 (1H\*, m), 4,91 (1H\*, d, J 17,0, 5,28 (1H\*, s), 5,31 (1H, s), 6,21 (1H, d, J 8,3), 6,46 (1H, d, J 8,3), 6,48 (1H\*, d, J 8,3), 6,94-7,32 (15H, m); <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 25,5 (CH<sub>2</sub>), 26,0 (\*CH<sub>2</sub>), 42,8 (\*CH<sub>2</sub>), 45,8 (CH<sub>2</sub>), 55,0, 55,8, 56,1, 56,7, 74,2 (\*CH<sub>2</sub>), 74,9 (CH<sub>2</sub>), 110,2 (CH), 110,7 (\*CH), 121,1 (CH), 122,0 (\*CH), 126,4, 126,7, 126,8, 127,0, 127,8, 127,9, 128,3, 128,5, 128,6, 128,7, 128,8, 129,0, 129,5, 129,5, 129,8, 137,5 (q), 127,7 (\*q), 139,3 (q), 139,3 (\*q), 139,9 (q), 140,7 (\*q), 144,4 (q), 144,7 (\*q) 150,7 (\*q), 151,6 (q), 172,2 (q), 172,7 (\*q), 177,7 (q); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -39,1 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, c0,68); IR (cm<sup>-1</sup>, pastilla de KBr) 3425 (O-H), 1626 (C=O), 1601 (C=O). \* indica el rotámero minoritario.

### Ejemplo 20: Acilación de isoquinolina y cristalización.

#### Etapas de acilación

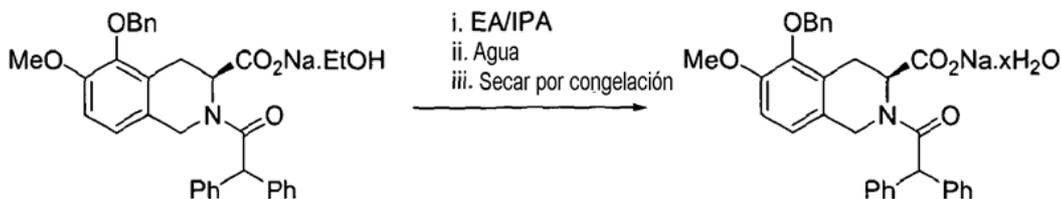


25 Se enfrió una suspensión de diclorometano (DCM), isoquinolina (1,0 eq.) y piridina (6,0 eq.) hasta -12 ± 2°C bajo una atmósfera inerte de nitrógeno. Se añadió gradualmente clorotrimetilsilano (4,0 eq.) a la suspensión mientras se mantenía una temperatura interna de -10°C o menos. Después de completarse la adición, resultará una disolución aproximadamente homogénea. Se agitó la mezcla de reacción durante un mínimo de 20 minutos y se ajustó la temperatura interna a -12 ± 2°C. Entonces se añadió gradualmente una en disolución DCM de cloruro de difenilacetilo (0,9 eq.) a la mezcla de reacción mientras se mantenía una temperatura interna de menos de -10°C. Se agitó la mezcla de reacción durante un mínimo de 15min tras completarse la adición mientras se mantenía una temperatura interna de menos de -10°C.

Se extinguió la reacción con ácido clorhídrico 2 M y se calentó la mezcla hasta +20 ± 5°C. Se detuvo la agitación y se dejó que sedimentase la mezcla bifásica durante un mínimo de 15 minutos. Se separó la fase inferior (orgánica).

Se añadió disolución de etóxido de sodio (al 21% en etanol, 1,0 eq.) a la fase orgánica y se evaporó la disolución resultante para dar el solvato de etanol de la sal de sodio, el compuesto 4.

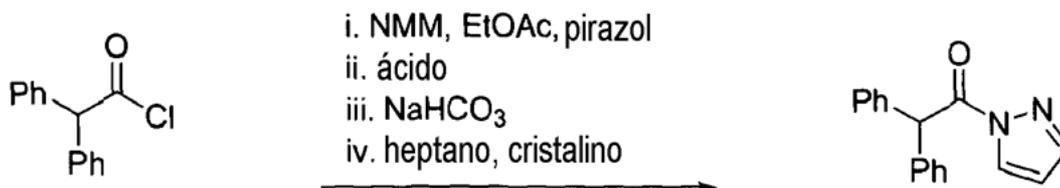
#### Etapa de cristalización



- 5 Se disolvió el solvato de etanol de la sal de sodio en bruto, el compuesto 4, en acetato de etilo (EA) y luego se concentró. Se disolvió el residuo en acetato de etilo y luego se agitó a  $+20\pm 55^{\circ}\text{C}$ . Se añadió gradualmente en una adición controlada a la disolución de acetato de etilo con agitación. Esto provoca la cristalización del solvato de iso-propanol, el compuesto 5. Tras completarse la adición, se agitó la mezcla durante una hora. Se filtraron los cristales y se lavaron con iso-propanol. Se secaron los cristales a vacío hasta que los niveles de iso-propanol fueran de menos del 10%. Se añadieron los cristales a un volumen de agua RO con agitación provocando que se produjera una rápida disolución. Se agitó la disolución resultante durante dos horas permitiendo que se formase un precipitado espeso. Entonces se secó por congelación la suspensión resultante dando el compuesto 2 como un polvo blanquecino.

#### Ejemplo 21:

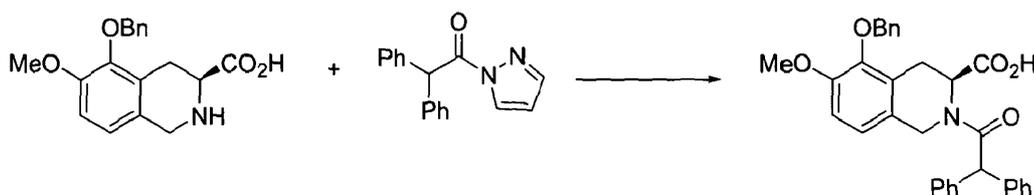
- 15 Formación de éster activo de pirazol



- 20 Se puso un recipiente con camisa de acero inoxidable o de vidrio bajo una atmósfera inerte. En el recipiente se cargaron pirazol (1,1 eq.), N-metilmorfolina (NMM) (1,3 eq.) y acetato de etilo. Se añadió gradualmente una disolución en acetato de etilo de cloruro de difenilacetilo (1,0 eq.). Se aplicó enfriamiento al recipiente de reacción de modo que se mantuviese una temperatura interna inferior a  $+30^{\circ}\text{C}$ . Tras completarse la adición, se agitó el contenido durante un mínimo de 20 minutos. Se lavó la mezcla de reacción con agua, ácido sulfúrico 1 M (2 veces), bicarbonato de sodio acuoso saturado (2 veces), agua y salmuera. Se concentró la fase de acetato de etilo y se separó el residuo con heptano.

- 25 Se calentó el residuo hasta  $70^{\circ}\text{C}$  en heptano de modo que se disolvieran todos los sólidos. Se enfrió la disolución resultante y se mantuvo a  $15\pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 1 h con cristalización simultánea. Se filtraron los cristales y se secaron durante un mínimo de 16 h. Rendimiento: 80-90% a partir de cloruro de difenilacetilo.

#### Acilación de isoquinolina



- 30 Se puso un recipiente con camisa de acero inoxidable o de vidrio bajo una atmósfera inerte. En el recipiente se cargaron DMF, tetrametilguanidina (1,03 eq.) e isoquinolina (1,0 eq.). Se agitó la mezcla durante aproximadamente 1 h para permitir que se produjera la disolución (sólo se espera disolución parcial en esta etapa). En la mezcla de reacción se cargó éster activo de pirazol (1,2 eq.). Se agitó la mezcla de reacción durante un mínimo de 16 h. Se realizó una IPC (HPLC) para verificar la extensión de la reacción (condición de paso:  $< 5,00\%$  de isoquinolina restante). Se cargó dimetiletilendiamina (0,3 eq.) en la mezcla de reacción y se continuó con la agitación durante 2 h más. Se realizó una IPC (HPLC) para éster activo de pirazol (condición de paso:  $< 0,10\%$  de éster activo de pirazol).

Se diluyó la mezcla de reacción con tolueno y se lavó con ácido sulfúrico 1 M (2 veces) y agua (2 veces). Se redujo el volumen de la fase orgánica a través de evaporación del disolvente. Se cargó etóxido de sodio (1,0 eq.) en la mezcla de reacción. Se evaporó el disolvente restante de la mezcla de reacción. Se evaporó el residuo del acetato de etilo.

- 5 Se agitó el producto en bruto en acetato de etilo y se transfirió la mezcla a un recipiente con agitación. Se cargó isopropanol en la disolución en acetato de etilo en una adición controlada provocando que se produjera cristalización. Se agitó la mezcla durante un mínimo de 1 h. Se filtraron los cristales y se lavaron con un pequeño volumen de isopropanol. Se secaron los cristales a vacío durante un mínimo de 16 h dando el compuesto 5.

- 10 Se cargó agua en un recipiente de acero inoxidable o revestido de vidrio. Se ajustó la temperatura interna a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se cargaron lentamente los cristales del compuesto 5 en agua, permitiendo que se produjera la disolución. Se dispensó la disolución caliente a bandejas Lyoguard y se cargaron en el secador por congelación. Se llevó a cabo el secado primario con una temperatura de estante de  $-5^\circ\text{C}$  a lo largo de al menos 3 días. Se llevó a cabo la fase de secado secundario con una temperatura de estante de  $+25^\circ\text{C}$  a lo largo de al menos 24 h. Se realizó una IPC (KF) para verificar un contenido en agua aceptable (condición de paso:  $<15,0\%$  de agua). Se retiró el compuesto 2 de las bandejas Lyoguard y se puso en un contenedor apropiado. Rendimiento: 80-90% a partir de isoquinolina.
- 15

### Ejemplo 22:

#### Biodisponibilidad del compuesto 2

Se administró por vía oral el compuesto 2 en cápsulas de HPMC en cantidades variables, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg y 200 mg, una vez al día durante siete días a sujetos de sexo masculino sanos (18-55 años de edad).

- 20 Se extrajeron muestras de sangre a intervalos regulares tras cada dosis y se analizó el plasma derivado de las muestras de sangre para determinar los niveles del compuesto 1. Se usaron los datos obtenidos para calcular parámetros farmacológicos tal como se muestra en la tabla 37.

Tabla 37: Parámetros farmacológicos para el compuesto 2

Dosis (mg)	Media (D.E.) por cohorte					
	$T_{\text{máx}}$ (h)	$C_{\text{máx}}$ (ng/ml)	$AUC_{0-24}$ (h*ng/ml)	$K_{\text{el}}$ (1/h)	$T_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/ml)
10	1,10 (0,74) n = 15	34,5 (18,3) n = 15	66,4 (22,2) n = 15	0,123 (0,071) n = 15	8,05 (5,31) n = 15	69,9 (24,4) n = 15
25	1,50 (0,89) n=8	112,6 (78,2) n=8	194,6 (72,5) n=8	0,079 (0,029) n=7	10,68 (6,56) n=7	223,8 (60,0) n=7
50	1,0 (0,84) n=6	207,6 (101,8) n=6	334,5 (83,6) n=6	0,075 (0,044) n=6	13,44 (9,40) n=6	353,5 (78,4) n=6
100	1,29 (0,95) n=7	451,3 (310,2) n=7	720,9 (181,1) n=7	0,066 (0,017) n=7	11,20 (3,21) n=7	758,7 (171,0) n=7
200	1,14 (0,63) n=7	589,0 (367,0) n=7	1307,5 (572,3) n=7	0,073 (0,038) n=7	13,15 (9,43) n=7	1369,1 (583,7) n=7

n = número de sujetos en cada nivel de dosis.

### Ejemplo 23:

- 25 Análisis farmacocinético de los compuestos 2 (amorfo), 6, 7 y 1 en perros Beagle macho tras una única dosis oral

- 30 Se diseñó el estudio para comparar los perfiles PK de las siguientes cuatro formas del compuesto 1 administradas como cápsulas orales individuales en estado de ayuno. Se resume el esquema de aleatorización para los animales en la tabla a continuación. En resumen, el estudio consistía en 4 perros macho; cada uno recibió dosis únicas de 10 mg/kg de cada uno de los cuatro compuestos: el compuesto 2: la sal de sodio amorfo, el compuesto 6, el compuesto 7 y el compuesto 1: ácido carboxílico libre. Hubo un periodo de lavado de 4 días entre dosificaciones. Se extrajeron muestras de sangre de cada animal en momentos predeterminados en los días del estudio 1, 4, 8 y 11. Se analizó el plasma para determinar el compuesto 1 mediante un ensayo de HPLC-EM/EM validado.

Animal	Día 1	Día 4	Día 8	Día 11
1	A	D	C	B
2	B	A	D	C
3	C	B	A	D
4	D	C	B	A

A – compuesto 2 (amorfo)  
 B – compuesto 6  
 C – compuesto 7  
 D – compuesto 1

5 Se determinaron parámetros PK descriptivos mediante métodos independientes de modelo convencional (Gibaldi y Perrier, 1982) basándose en los datos individuales de concentración en plasma-tiempo. Se redondearon las concentraciones en plasma a 3 cifras significativas. A las muestras de plasma con concentraciones por debajo del límite de ensayo cuantificable (BQL < 2,00 ng/ml) se les asignaron valores de cero para cálculos de medios. Para cálculos PK, se ajustó BQL a cero desde el tiempo previo a la dosis hasta el tiempo de la primera concentración cuantificable y después de eso se ajustó como ausente. Se usaron puntos de tiempo nominales para todos los cálculos.

- $C_{m\acute{a}x}$  es la máxima concentración en plasma observada después de la dosificación.
- $T_{m\acute{a}x}$  es el tiempo hasta alcanzar la  $C_{m\acute{a}x}$ .
- 10 •  $T_{1/2}$  es la semivida aparente calculada mediante  $\ln(2)/\lambda$  donde  $\lambda$  es la constante de velocidad para la parte log-lineal de la fase terminal. Se requiere un mínimo de tres valores en la fase tras la distribución de la curva de concentración en plasma-tiempo para el cálculo de  $\lambda$ .
- $AUC_{(0-T)}$  es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde tiempo cero hasta tiempo de la última concentración en plasma medible determinada usando la regla trapezoidal lineal.
- 15 •  $AUC_{(0-inf)}$  es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde tiempo cero hasta infinito. Se calcula sumando  $AUC_{(0-T)}$  y el área extrapolada desde T hasta infinito.

Se realizaron análisis PK mediante análisis no compartimental usando el modelo 200 en WinNonlin Professional 6.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

20 En las tablas 38, 39, 40 y 41, respectivamente, se presentan valores individuales de media y de D.E. para las concentraciones en plasma y los parámetros PK del compuesto 1 tras el compuesto 2 (amorfo), el compuesto 6, el compuesto 7 y el compuesto 1: ácido carboxílico libre. En la tabla 42, se resumen los parámetros PK medios del compuesto 1. En la figura 11, se muestran los perfiles medios de concentración en plasma-tiempo del compuesto 1 tras diferentes formas y en la figura 12, se presentan la  $C_{m\acute{a}x}$  y  $AUC_{(0-inf)}$  medias.

25 Tras una única dosis oral del compuesto 1 a 10 mg/kg, los valores de la mediana de  $T_{m\acute{a}x}$  fueron de 0,750, 1,00, 1,00 y 2,00 horas para el compuesto 2: sal de sodio amorfo, el compuesto 6, el compuesto 7 y el compuesto 1: ácido carboxílico libre, respectivamente (tabla 42). Los valores de  $C_{m\acute{a}x}$  medios correspondientes fueron de  $1590 \pm 534$ ,  $1320 \pm 1050$ ,  $1260 \pm 428$  y  $294 \pm 238$  ng/ml, respectivamente (tabla 42). Los valores de  $AUC_{(0-inf)}$  medios fueron de  $1840 \pm 516$ ,  $1930 \pm 1240$ ,  $2440 \pm 542$  y  $680 \pm 412$  ng·h/ml, respectivamente. El AUC tras el compuesto 6 y el ácido carboxílico libre tuvieron una mayor variabilidad entre sujetos que el compuesto 2 amorfo y el compuesto 7 de hidrato (oscilando los valores del % de CV entre el 60,6% y el 81,1%; véase la tabla 42). El compuesto 7 de hidrato dio como resultado el mayor AUC medio mientras que el compuesto 1 de ácido carboxílico libre dio como resultado el menor AUC. Los valores de  $T_{1/2}$  armónicos medios fueron de  $2,49 \pm 0,391$ ,  $2,82 \pm 1,18$ ,  $4,36 \pm 3,16$  y  $2,11 \pm 0,115$  horas para el compuesto 2: sal de sodio amorfo, el compuesto 6, el compuesto 6 y el compuesto 1 de ácido carboxílico libre, respectivamente (figura 11 y tabla 42).

35 Se observó el  $T_{m\acute{a}x}$  más prolongado tras el compuesto 1 de ácido carboxílico libre a un valor de mediana de 2 horas en comparación con de 0,75 a 1 hora para el compuesto 2 (amorfo), el compuesto 6 y el compuesto 7. Se observó el mayor valor de  $C_{m\acute{a}x}$  medio tras el el compuesto 2 (amorfo) ( $1590 \pm 534$  ng/ml) y se observó el mayor valor de AUC medio tras el compuesto 6 ( $2440 \pm 542$  ng·h/ml).

Tabla 38: Concentraciones en plasma (ng/ml) y parámetros PK del compuesto 1 en perros tras una única dosis oral de 10 mg/kg de la forma amorfa del compuesto 2

Parámetro	Tiempo (h)	I.D. de perro				N	Media	D.E.	% de CV
		301	302	303	304				
	Previo a la dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	4	0,00	0,00	NA
	0,25	BQL	BQL	BQL	26,5	4	6,63	13,3	200
	0,5	597	14,1	BQL	2.270	4	720	1.070	149
	0,75	1.110	146	1.750	1.090	4	1.020	661	64,5
	1	830	1.220	835	880	4	941	187	19,9
	2	148	763	195	345	4	363	280	77,1
	4	25,5	48,6	44,4	54,1	4	43,2	12,4	28,8
	8	9,07	19,4	16,4	23,1	4	17,0	5,95	35,0
	12	2,81	6,39	2,95	7,53	4	4,92	2,40	48,8
	24	BQL	20,7	6,83	BQL	4	6,88	9,76	142
$T_{m\acute{a}x}^a$ , h		0,750	1,00	0,750	0,500	4	0,750	0,5-1	27,2
$C_{m\acute{a}x}$ , ng/ml		1.110	1.220	1.750	2.270	4	1.590	534	33,6
$AUC_{(0-T)}$ , ng·h/ml		1.290	2.350	1.520	2.180	4	1.830	512	27,9
$AUC_{(0-inf)}$ , ng·h/ml		1.300	2.350	1.520	2.220	4	1.840	516	28,0
$T_{1/2}$ , h		2,51	2,73	2,05	2,81	4	2,49	0,391	15,7

<sup>a</sup> Expresado como mediana y rango  
<sup>b</sup> Expresado como media armónica y pseudo D.E.  
 BQL – por debajo del límite cuantificable < 2,00 ng/ml  
 NA – no aplicable

Tabla 39: Concentraciones en plasma (ng/ml) y parámetros PK del compuesto 1 en perros tras una única dosis oral de 10 mg/kg del compuesto 6

Parámetro	Tiempo (h)	I.D. de perro				N	Media	D.E.	% de CV
		301	302	303	304				
	Previo a la dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	4	0,00	0,00	NA
	0,25	BQL	313	BQL	1.180	4	373	558	149
	0,5	BQL	255	8,80	2.560	4	706	1.240	176
	0,75	5,31	588	180	1.520	4	573	677	118
	1	27,7	1.790	252	857	4	732	788	108
	2	658	1.170	160	161	4	537	483	89,8
	4	55,2	52,0	24,0	70,9	4	50,5	19,5	38,6
	8	9,17	12,0	12,1	12,8	4	11,5	1,60	13,9
	12	4,50	5,90	4,11	5,68	4	5,05	0,877	17,4
	24	BQL	2,00	10,3	BQL	4	3,08	4,91	159
$T_{m\acute{a}x}^a$ , h		2,00	1,00	1,00	0,500	4	1,00	0,5-2	55,9
$C_{m\acute{a}x}$ , ng/ml		658	1.790	252	2.560	4	1.320	1.050	80,2
$AUC_{(0-T)}$ , ng·h/ml		1.220	3.430	660	2.370	4	1.920	1.230	64,2
$AUC_{(0-inf)}$ , ng·h/ml		1.230	3.440	661	2.380	4	1.930	1.240	64,2
$T_{1/2}$ , h		2,21	6,48	3,14	2,03	4	2,82	1,18	41,8

<sup>a</sup> Expresado como mediana y rango  
<sup>b</sup> Expresado como media armónica y pseudo D.E.  
 BQL – por debajo del límite cuantificable < 2,00 ng/ml  
 NA – no aplicable

5 Tabla 40: Concentraciones en plasma (ng/ml) y parámetros PK del compuesto 1 en perros tras una única dosis oral de 10 mg/kg del compuesto 6

Parámetro	Tiempo (h)	I.D. de perro				N	Media	D.E.	% de CV
		301	302	303	304				
	Previo a la dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	4	0,00	0,00	NA
	0,25	2,72	BQL	10,0	BQL	4	3,18	4,72	149
	0,5	16,1	199	813	83,2	4	278	365	131
	0,75	512	372	415	672	4	493	133	27,0
	1	1.060	269	857	1.850	4	1.010	653	64,8
	2	792	1.270	428	932	4	856	349	40,7

Parámetro	Tiempo (h)	I.D. de perro				N	Media	D.E.	% de CV
		301	302	303	304				
	4	67,9	60,1	49,0	83,5	4	65,1	14,5	22,3
	8	16,9	15,2	10,2	18,1	4	15,1	3,48	23,0
	12	5,79	4,22	6,63	8,07	4	6,18	1,61	26,0
	24	3,56	2,75	3,21	BQL	4	2,38	1,62	68,1
$T_{m\acute{a}x}^a$ , h		1,00	2,00	1,00	1,00	4	1,00	1-2	40,0
$C_{m\acute{a}x}$ , ng/ml		1.060	1.270	857	1.850	4	1.260	428	34,0
$AUC_{(0-T)}$ , ng·h/ml		2.320	2.510	1.750	3.080	4	2.410	550	22,8
$AUC_{(0-inf)}^b$ , ng·h/ml		2.340	2.520	1.790	3.110	4	2.440	542	22,2
$T_{1/2}^b$ , h		5,21	4,93	9,97	2,37	4	4,36	3,16	72,5

<sup>a</sup> Expresado como mediana y rango

<sup>b</sup> Expresado como media armónica y pseudo D.E.

BQL – por debajo del límite cuantificable < 2,00 ng/ml

NA – no aplicable

Tabla 41: Concentraciones en plasma (ng/ml) y parámetros PK del compuesto 1 en perros tras una única dosis oral de 10 mg/kg del compuesto 1 en forma de ácido carboxílico libre

Parámetro	Tiempo (h)	I.D. de perro				N	Media	D.E.	% de CV
		301	302	303	304				
	Previo a la dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	4	0,00	0,00	NA
	0,25	BQL	3,55	BQL	BQL	4	0,888	1,78	200
	0,5	15,9	5,52	BQL	BQL	4	5,36	7,50	140
	0,75	40,2	5,18	BQL	BQL	4	11,3	19,4	171
	1	139	8,08	2,32	81,4	4	57,7	65,1	113
	2	38,3	392	62,1	582	4	269	264	98,3
	4	16,1	35,0	29,7	29,6	4	27,6	8,07	29,2
	8	5,44	11,3	5,88	5,83	4	7,11	2,80	39,3
	12	BQL	2,15	BQL	2,31	4	1,12	1,29	115
	24	BQL	BQL	BQL	BQL	4	0,00	0,00	NA

$T_{m\acute{a}x}^a$ , h		1,00	2,00	2,00	2,00	4	2,00	1-2	28,6
$C_{m\acute{a}x}$ , ng/ml		139	392	62,1	582	4	294	238	81,1
$AUC_{(0-T)}$ , ng·h/ml		218	751	195	1.040	4	551	415	75,3
$AUC_{(0-inf)}^b$ , ng·h/ml		234	758	ND	1.050	3	680	412	60,7
$T_{1/2}^b$ , h		2,18	1,99	ND	2,17	3	2,11	0,115	5,45

<sup>a</sup> Expresado como mediana y rango

<sup>b</sup> Expresado como media armónica y pseudo D.E.

BQL – por debajo del límite cuantificable < 2,00 ng/ml

NA – no aplicable

ND – no determinado

Tabla 42: Resumen de parámetros PK medios del compuesto 1 en perros tras el compuesto 1, el compuesto 2 (amorfo), el compuesto 6 y el compuesto 7

Compuesto administrado	Estadística	$T_{m\acute{a}x}^a$ (h)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$AUC_{(0-T)}$ , ng·h/ml	$AUC_{(0-inf)}$ , ng·h/ml	$T_{1/2}^b$ , h
Sal de sodio amorfa del compuesto 2	N	4	4	4	4	4
	Media	0,750	159	1.840	1.840	2,49
	D.E.	0,5-1	53,4	515	516	0,391
	% de CV	27,2	33,6	28,0	28,0	15,7
Compuesto 6	N	4	4	4	4	4
	Media	1,00	132	1.920	1.930	2,82
	D.E.	0,5-2	105	1.230	1.240	1,18
	% de CV	55,9	80,2	64,0	64,2	41,8
Compuesto 7	N	4	4	4	4	4
	Media	1,00	126	2.420	2.440	4,36

ES 2 570 135 T3

Compuesto administrado	Estadística	T <sub>máx</sub> <sup>a</sup> (h)	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	AUC <sub>(0-T)</sub> , ng·h/ml	AUC <sub>(0-inf)</sub> , ng·h/ml	T <sub>1/2</sub> <sup>b</sup> , h
	D.E.	1-2	42,8	561	542	3,16
	% de CV	40,0	34,0	23,2	22,2	72,5
Compuesto 1	N	4	4	3	3	3
	Media	2,00	29,4	680	680	2,11
	D.E.	1-2	23,8	412	412	0,115
	% de CV	28,6	81,1	60,6	60,7	5,45
<sup>a</sup> Expresado como mediana y rango						
<sup>b</sup> Expresado como media armónica y pseudo D.E.						

## REIVINDICACIONES

1. Sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico y solvatos del mismo, en forma amorfa o en forma de un solvato cristalino.
- 5 2. Sal de sodio según la reivindicación 1, en la que el solvato es un solvato de etanol, solvato de iso-propanol o un hidrato que tiene de 2 a 5 moléculas de agua.
3. Sal de sodio según la reivindicación 2, en la que el solvato es un solvato de etanol o iso-propanol.
4. Sal de sodio según la reivindicación 2, en la que el solvato es un hidrato que tiene 2 moléculas de agua.
5. Sal de sodio según la reivindicación 2, en la que el solvato es un hidrato que tiene de 3 a 5 moléculas de agua.
- 10 6. Sal de sodio hidrato según la reivindicación 4, en la que dicho solvato cristalino presenta un espectro de difracción de rayos X de polvo que comprende un pico a  $19,3 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$  y opcionalmente presenta además un pico a  $18,2 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$ , y opcionalmente en la que dicho solvato cristalino presenta un espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  de estado sólido que comprende picos a 55,7, 128,2 y  $151,3 \text{ ppm} \pm 0,2 \text{ ppm}$ .
- 15 7. Sal de sodio hidrato según la reivindicación 5, en la que dicho solvato cristalino presenta un espectro de difracción de rayos X de polvo que comprende un pico a  $15,2 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$  y opcionalmente comprende además al menos dos picos seleccionados del grupo que consiste en 4,8, 7,3, 12,0, 12,6, 23,5 y  $24,5 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$ , y opcionalmente en la que dicho solvato cristalino presenta un espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  de estado sólido que comprende picos a 53,7, 122,9 y  $128,1 \text{ ppm} \pm 0,2 \text{ ppm}$ .
- 20 8. Solvato de etanol según la reivindicación 3, en el que dicho solvato cristalino presenta un espectro de difracción de rayos X de polvo que comprende un pico a  $14,3 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$  o presenta un espectro de difracción de rayos X de polvo que comprende un pico a  $14,7 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$ , o presenta un espectro de difracción de rayos X de polvo que comprende al menos dos picos seleccionados de un grupo que comprende a 14,3, 14,7, 26,9 y  $29,7 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$ , y opcionalmente en el que dicho solvato cristalino presenta un espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  de estado sólido que comprende picos a 18,4, 139,7 y  $141,4 \text{ ppm} \pm 0,2 \text{ ppm}$ .
- 25 9. Solvato de iso-propanol según la reivindicación 3, en el que dicho solvato cristalino presenta un espectro de difracción de rayos X de polvo que comprende al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en 20,6, 26,6, 27,2, 28,3 y  $29,3 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$  y opcionalmente comprende además al menos dos picos seleccionados del grupo que consiste en 25,0, 26,0, 26,6, 27,2, 28,3 y  $29,3 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$  o comprende además al menos un pico seleccionado del grupo que consiste en 10,8, 14,0, 21,1, 21,9 y  $22,5 \text{ grados } 2\theta \pm 0,1 \text{ grados } 2\theta$ , y opcionalmente en el que dicho solvato cristalino presenta un espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  de estado sólido que comprende picos a 63,1 y  $140,7 \text{ ppm} \pm 0,2 \text{ ppm}$ .
- 30 10. Composición farmacéutica que comprende la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico o un solvato de la sal de sodio junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico está en forma amorfa o en forma de un solvato cristalino.
- 35 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 formulada para administración oral.
12. Método de preparación de la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico o un solvato del mismo que comprende:
  - (i) tratar el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico con alcóxido de sodio;
  - 40 (ii) formar un solvato de alcohol cristalino de la sal de sodio resultante formada en (i); y
  - (iii) recristalizar el solvato.
13. Método según la reivindicación 12, en el que el solvato de alcohol cristalino es un solvato de etanol, un solvato de iso-propanol o un hidrato que tiene de 2 a 5 moléculas de agua.
- 45 14. Método según la reivindicación 12, en el que la molécula de alcohol del solvato de alcohol cristalino formado en la etapa (ii) se intercambia por otra molécula de solvato antes, durante o después de la etapa (iii), especialmente en

el que el solvato formado es un hidrato.

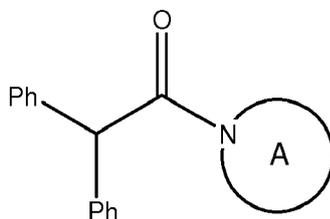
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o la reivindicación 14, en el que el solvato recristalizado en la etapa (iii) es un solvato de iso-propanol.

5 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende la etapa adicional de secado del solvato.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además acidificar la sal de sodio para formar el ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico en forma sustancialmente pura, en el que forma sustancialmente pura indica un producto que tiene una pureza química mayor del 96% y/o un e.e. mayor del 97%.

10 18. Método de preparación de un solvato de alcohol de la sal de sodio del ácido (S)-2-(difenilacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico que comprende las etapas de:

(i) acilar el átomo de nitrógeno de isoquinolina del ácido (S)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxi-5-(fenilmetoxi)-3-isoquinolin-carboxílico con una amida cíclica activada de fórmula:



15 en la que el anillo A es un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 miembros; y

(ii) tratar el producto de la etapa (i) con una sal de alcóxido en un disolvente de alcohol.

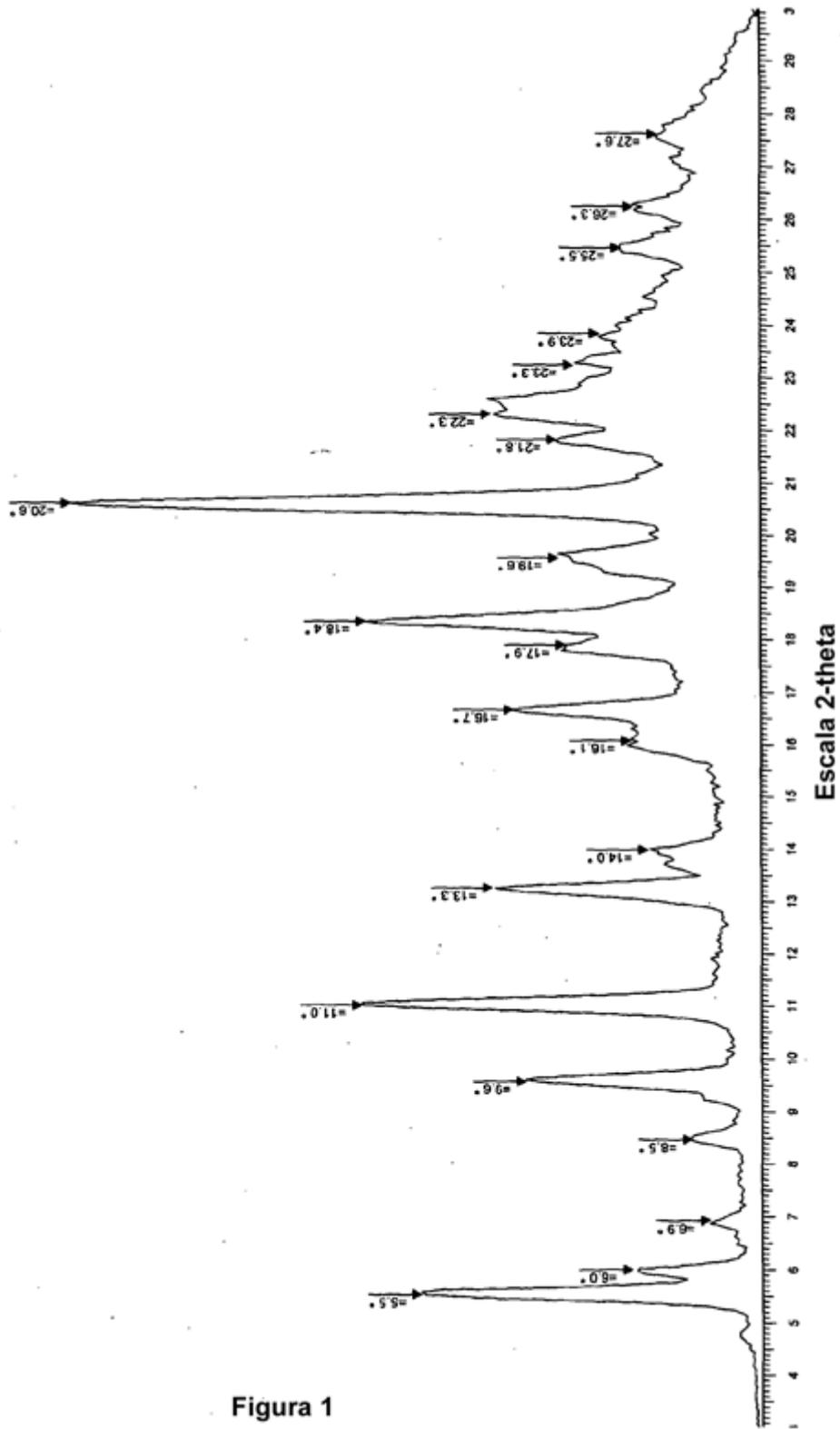


Figura 1

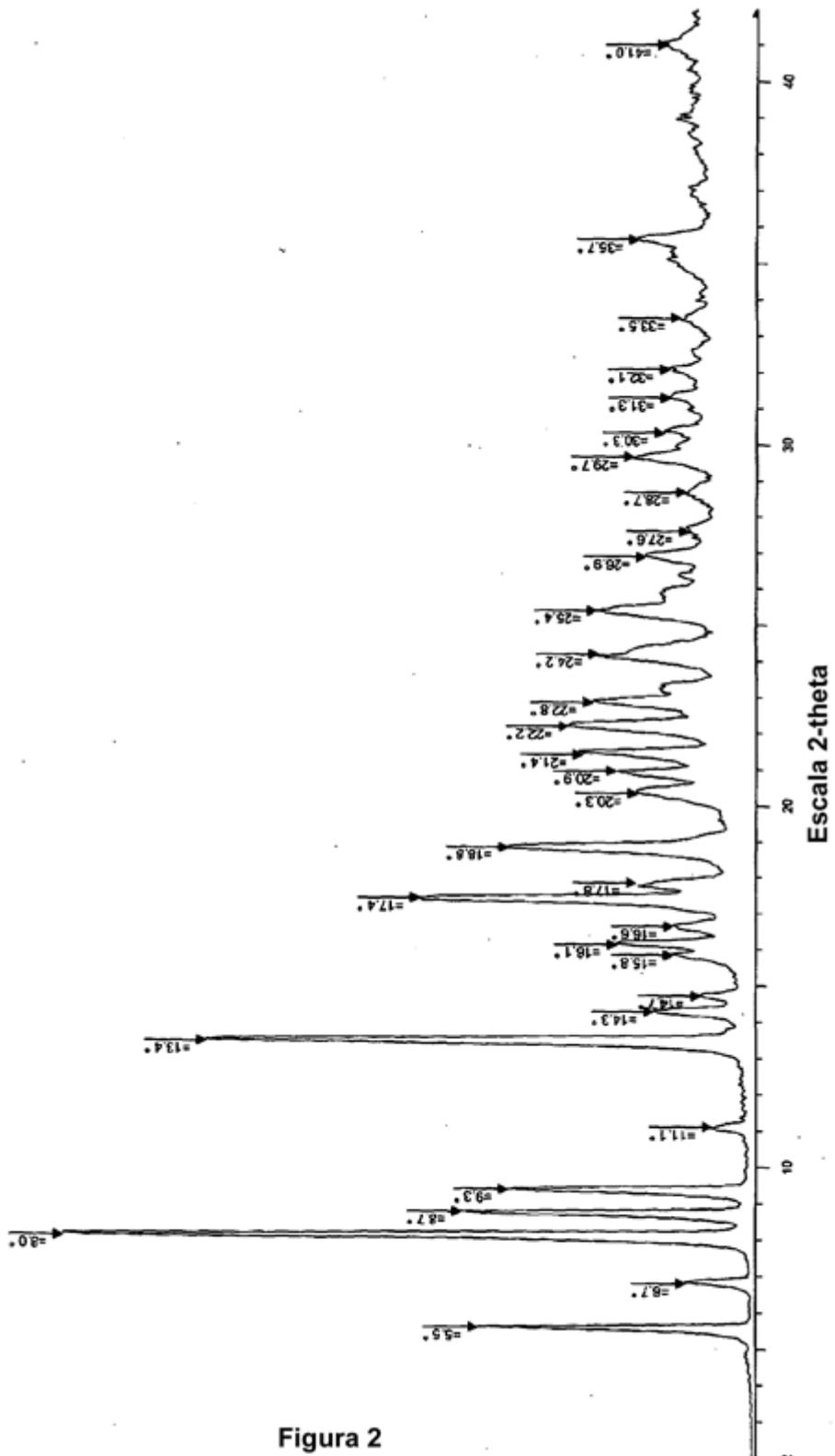


Figura 2

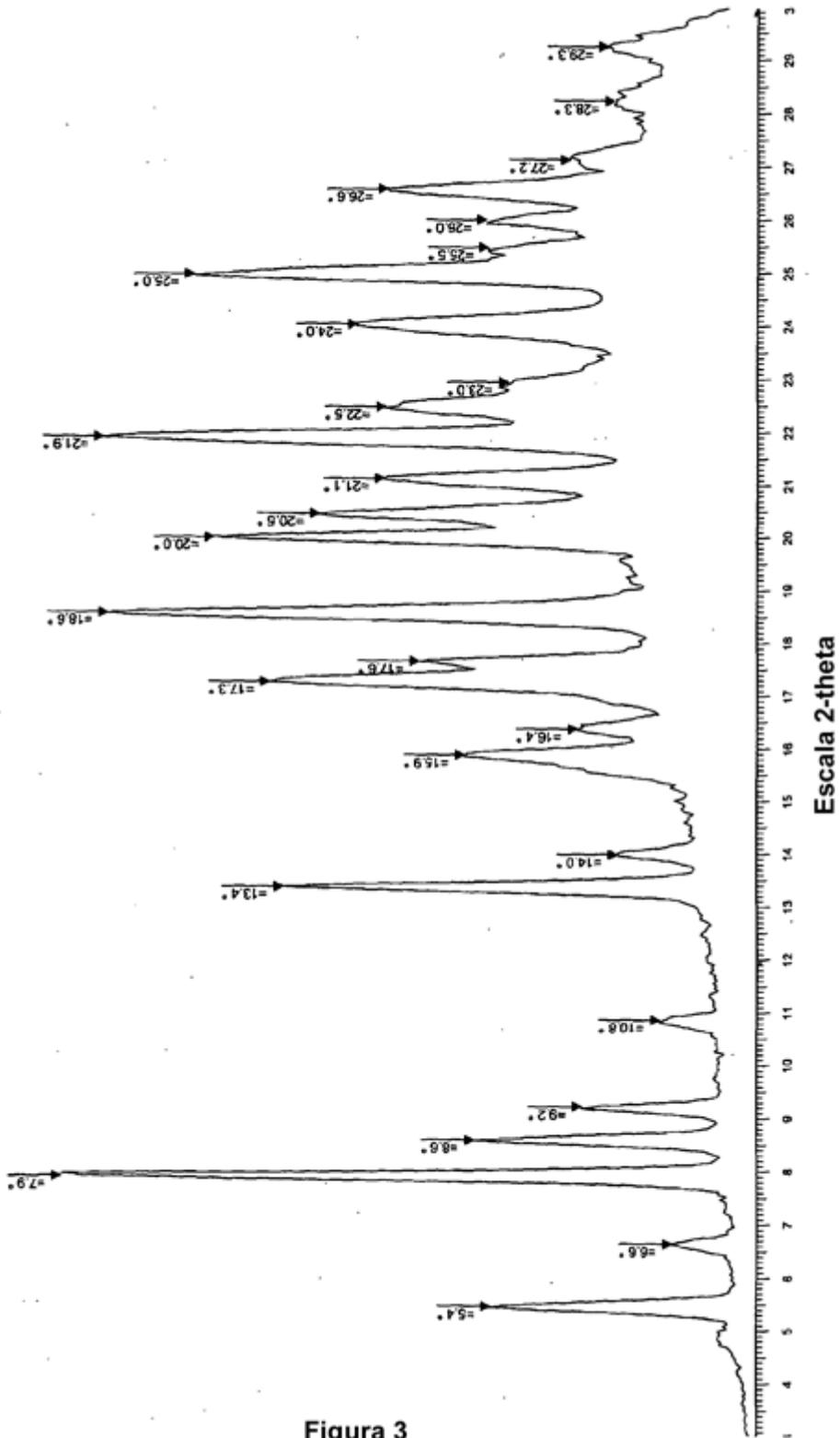


Figura 3

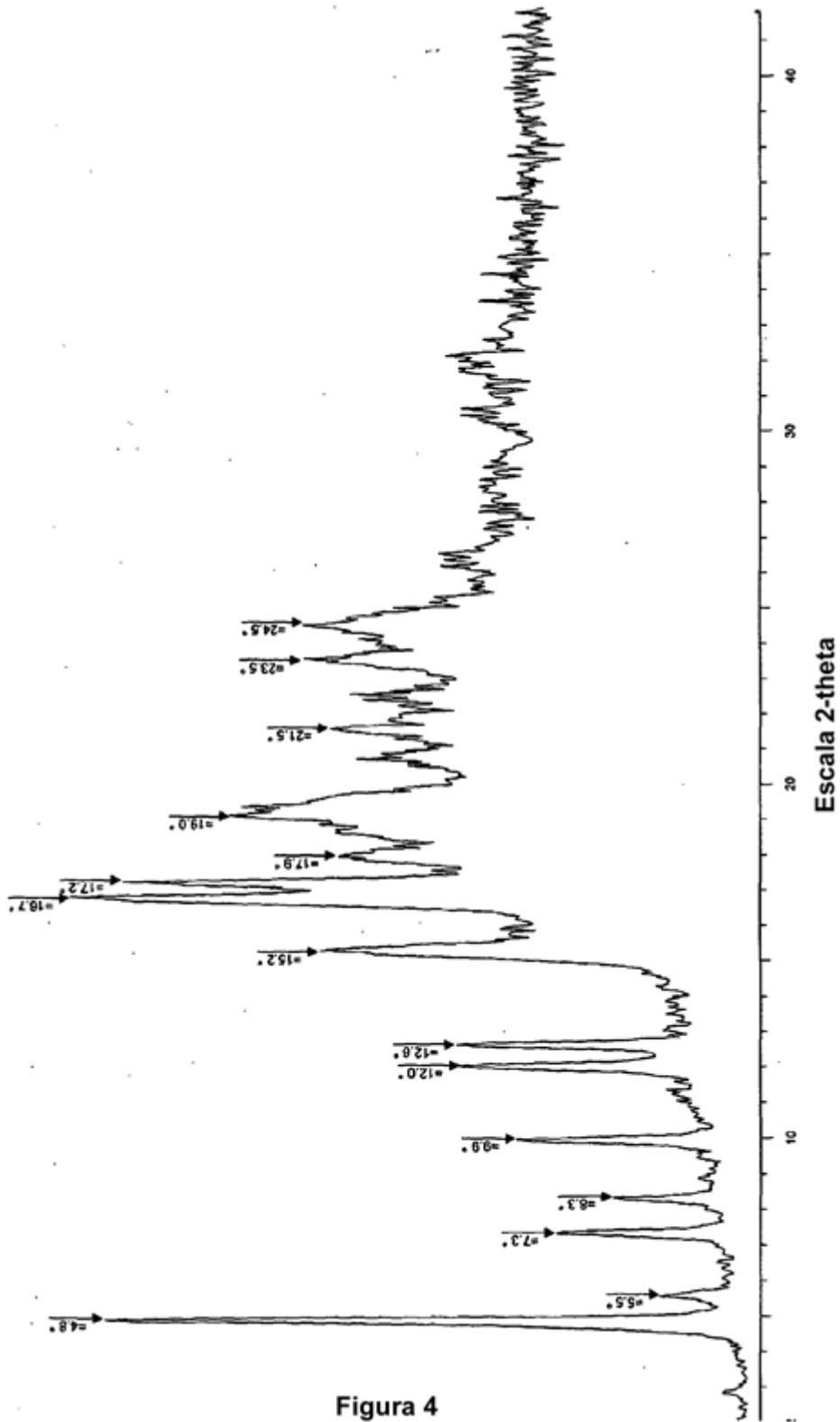


Figura 4

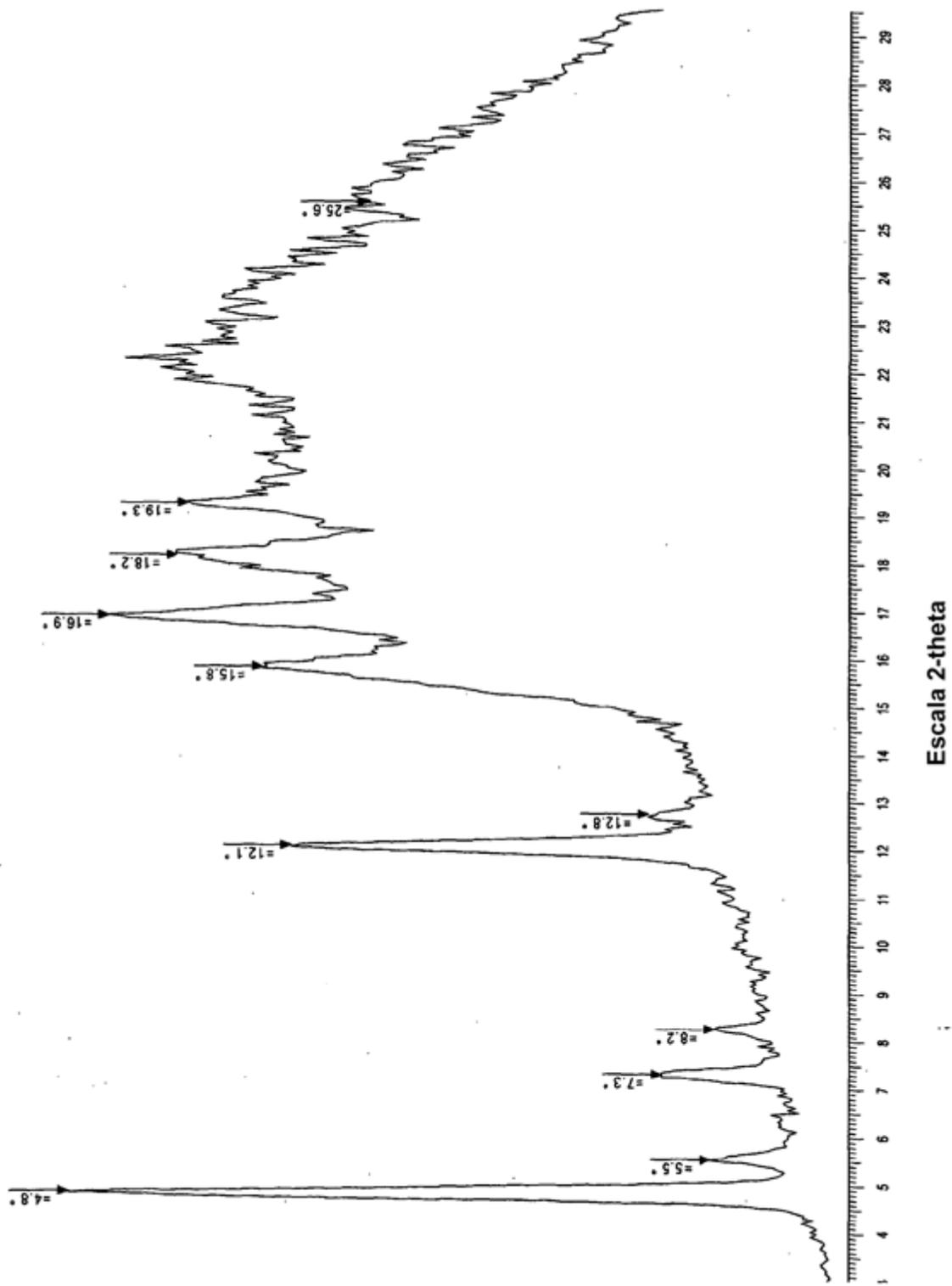


Figura 5

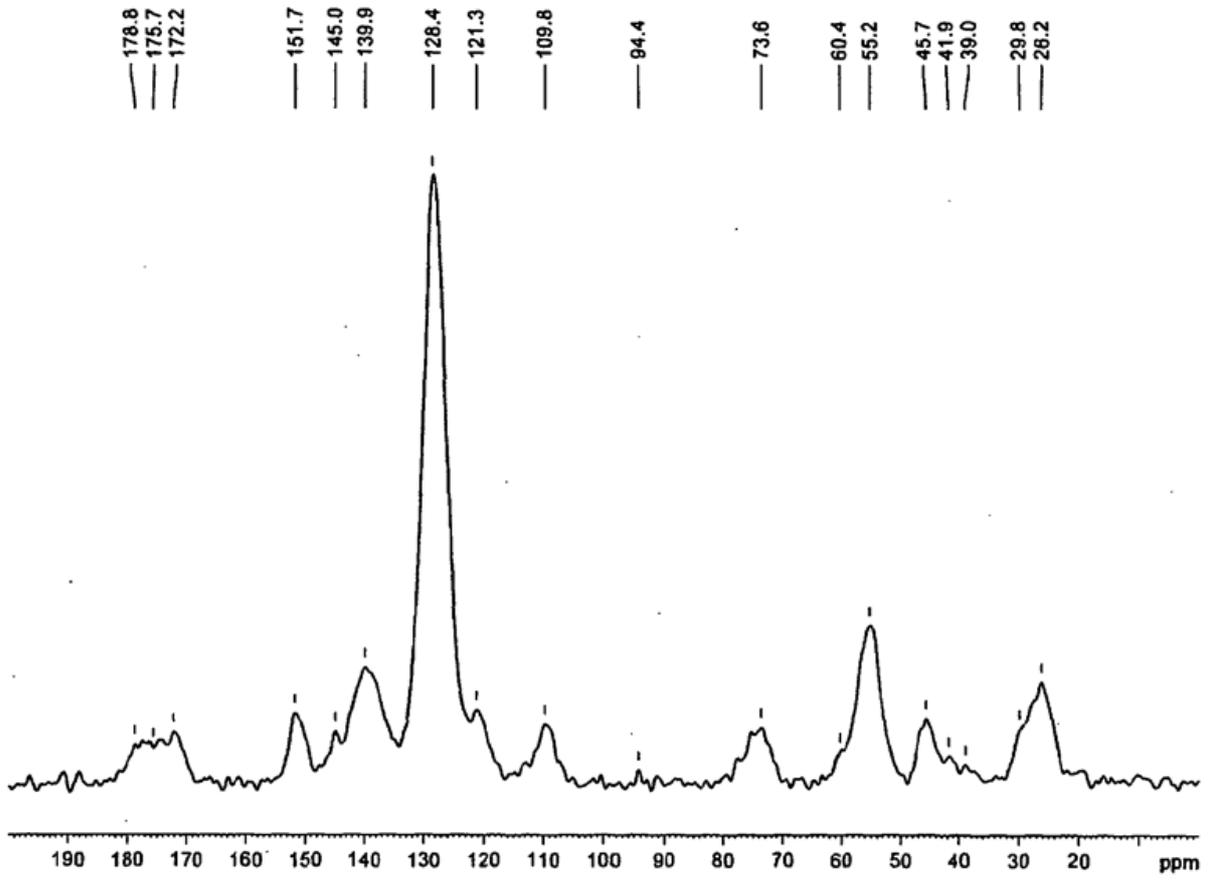


Figura 6

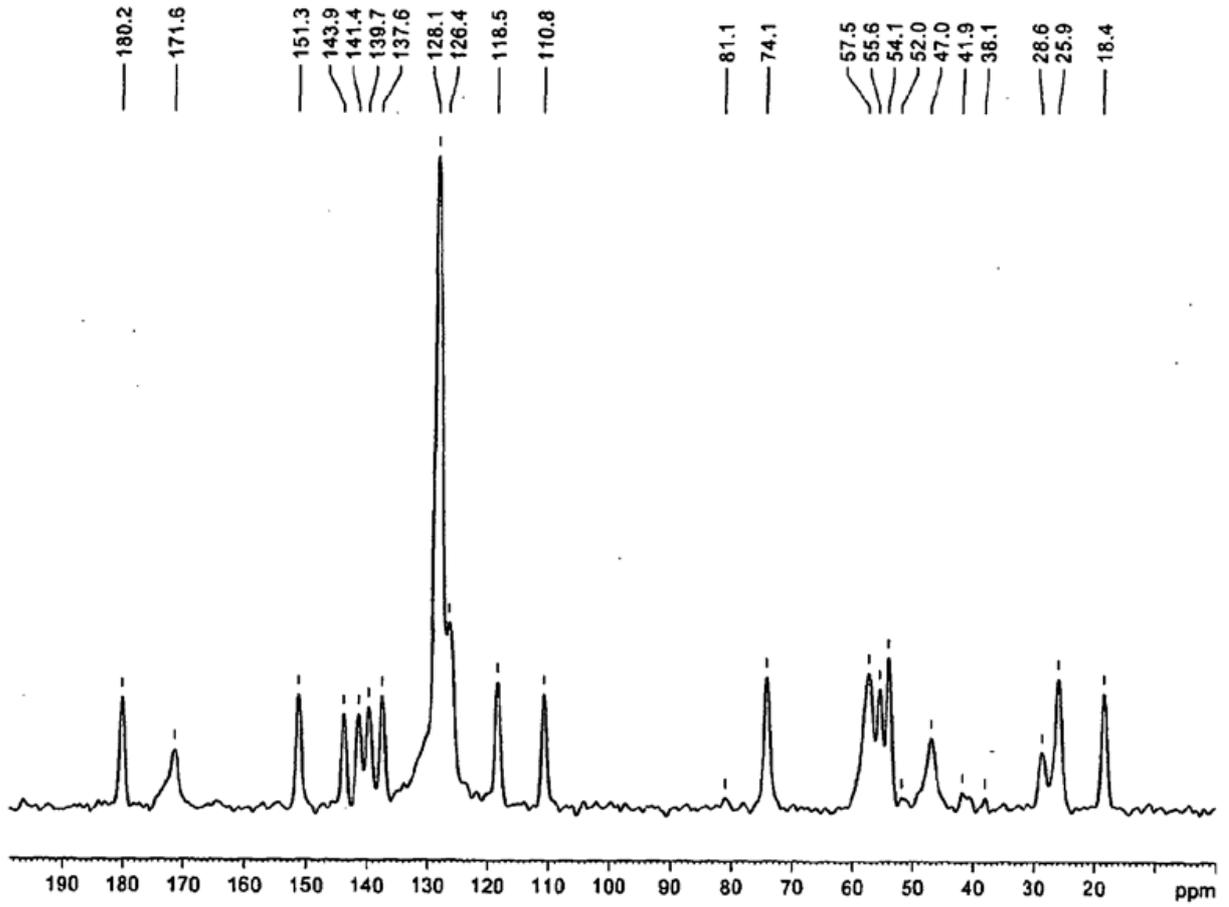


Figura 7

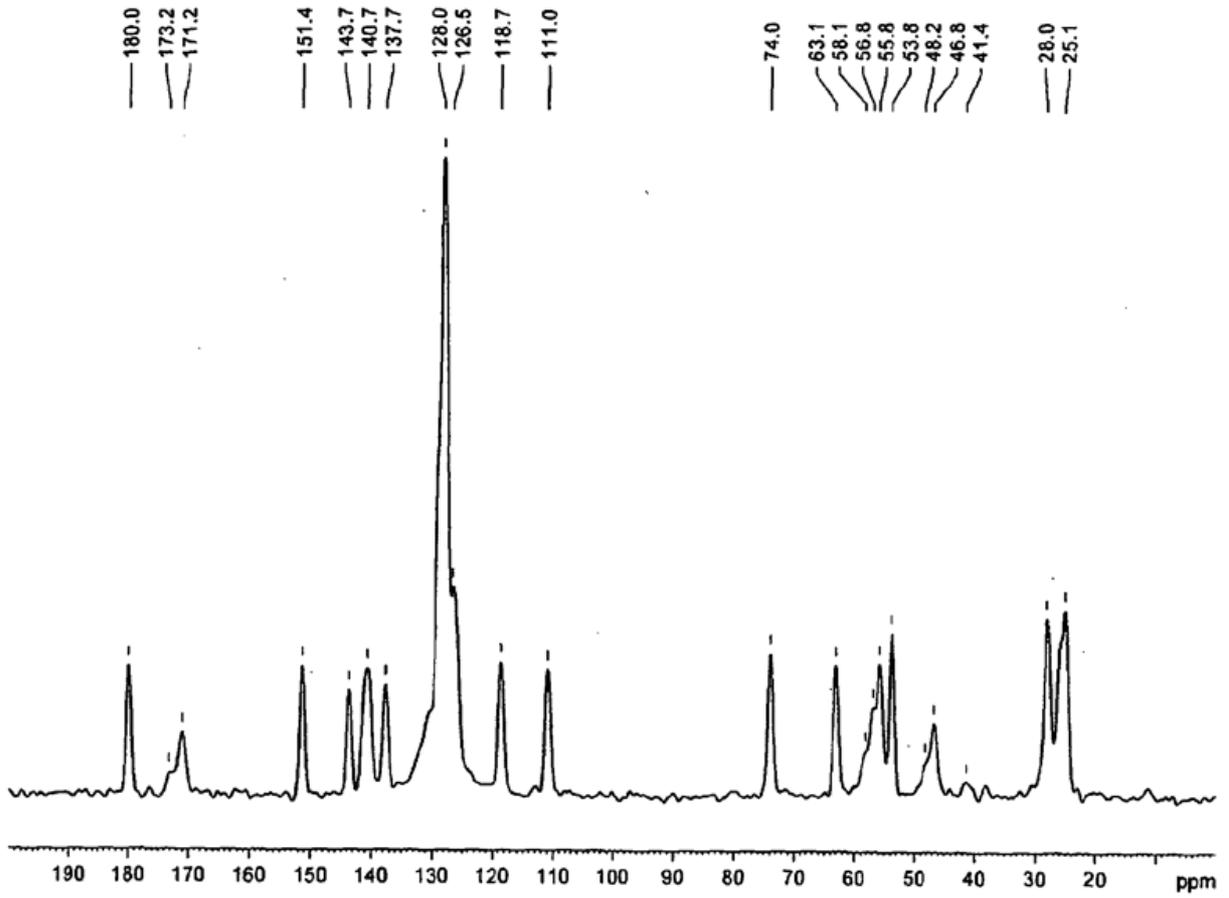


Figura 8

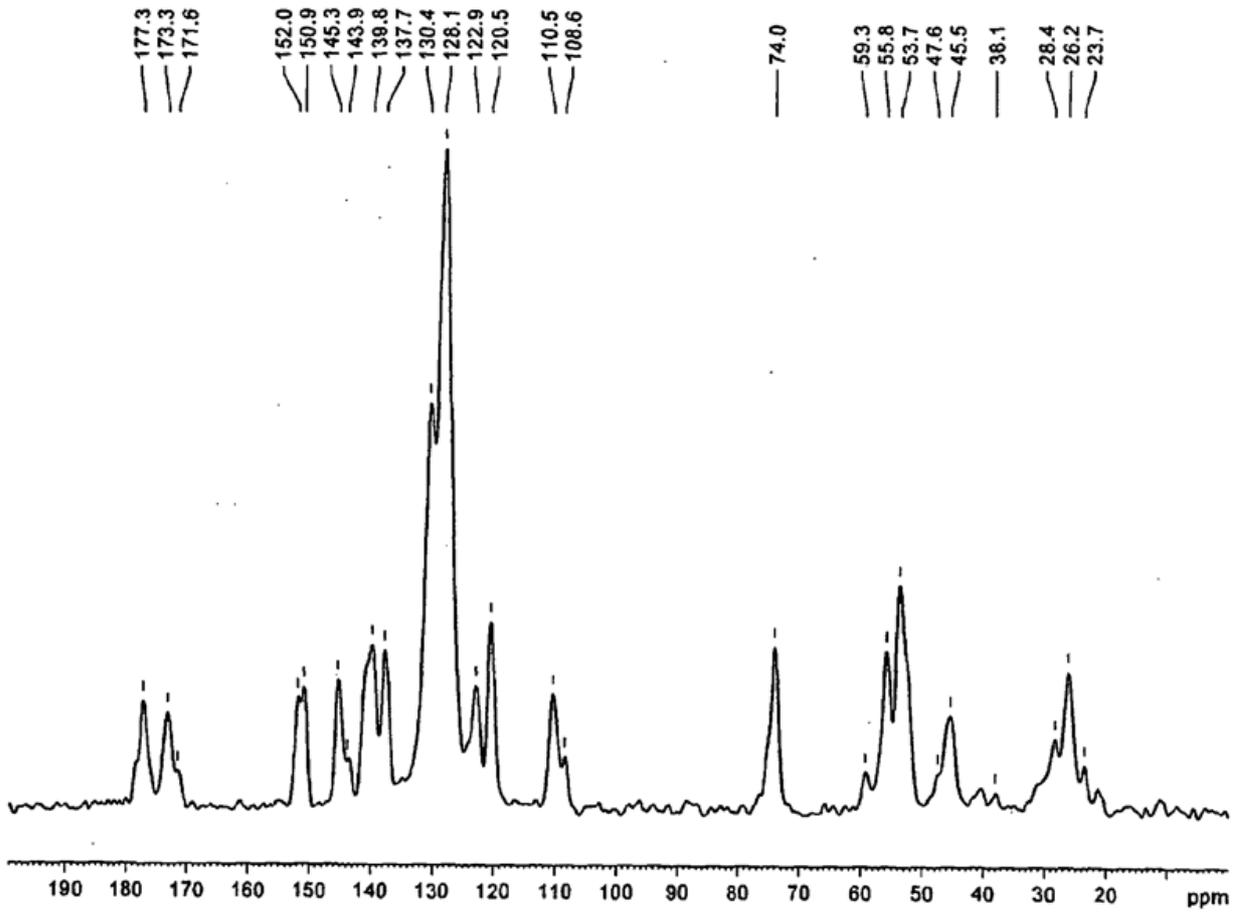


Figura 9

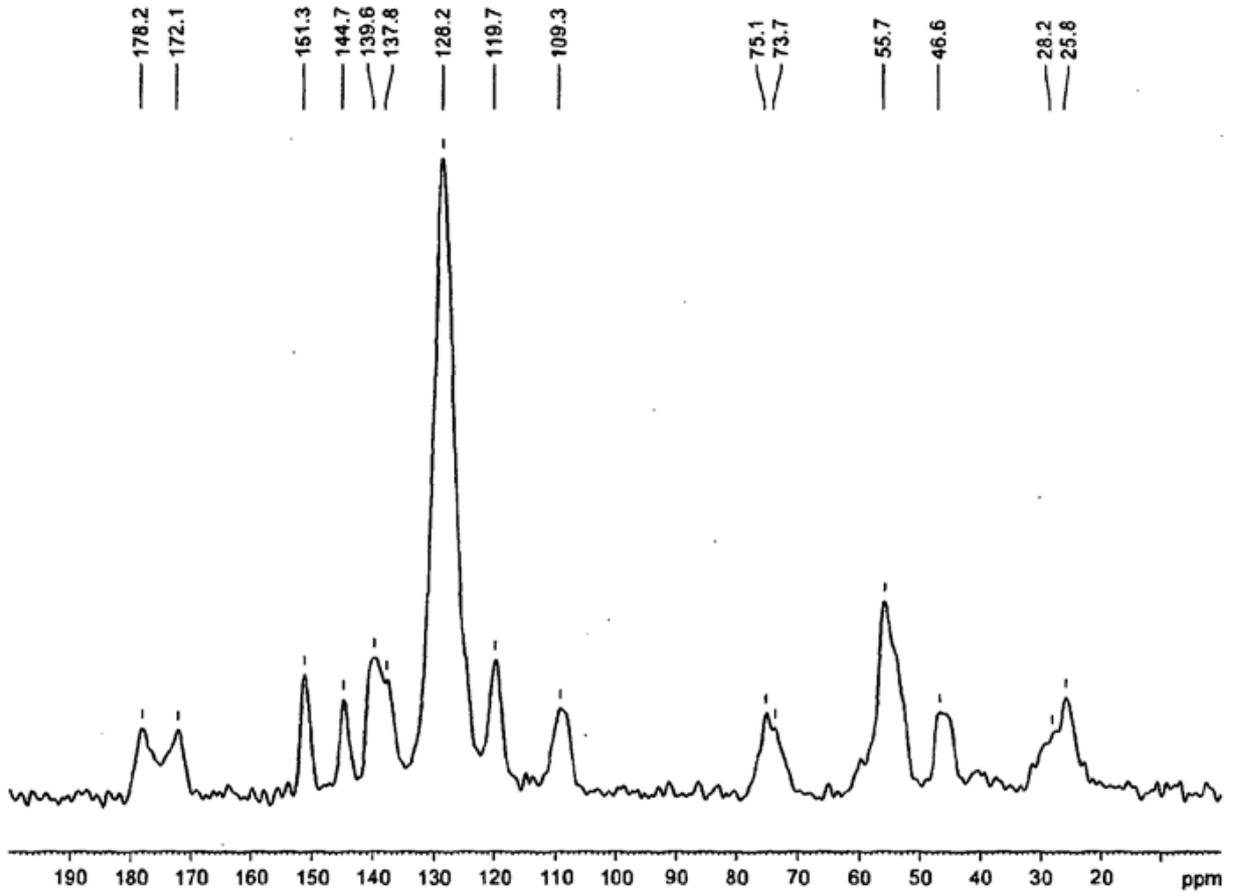


Figura 10

Escala lineal

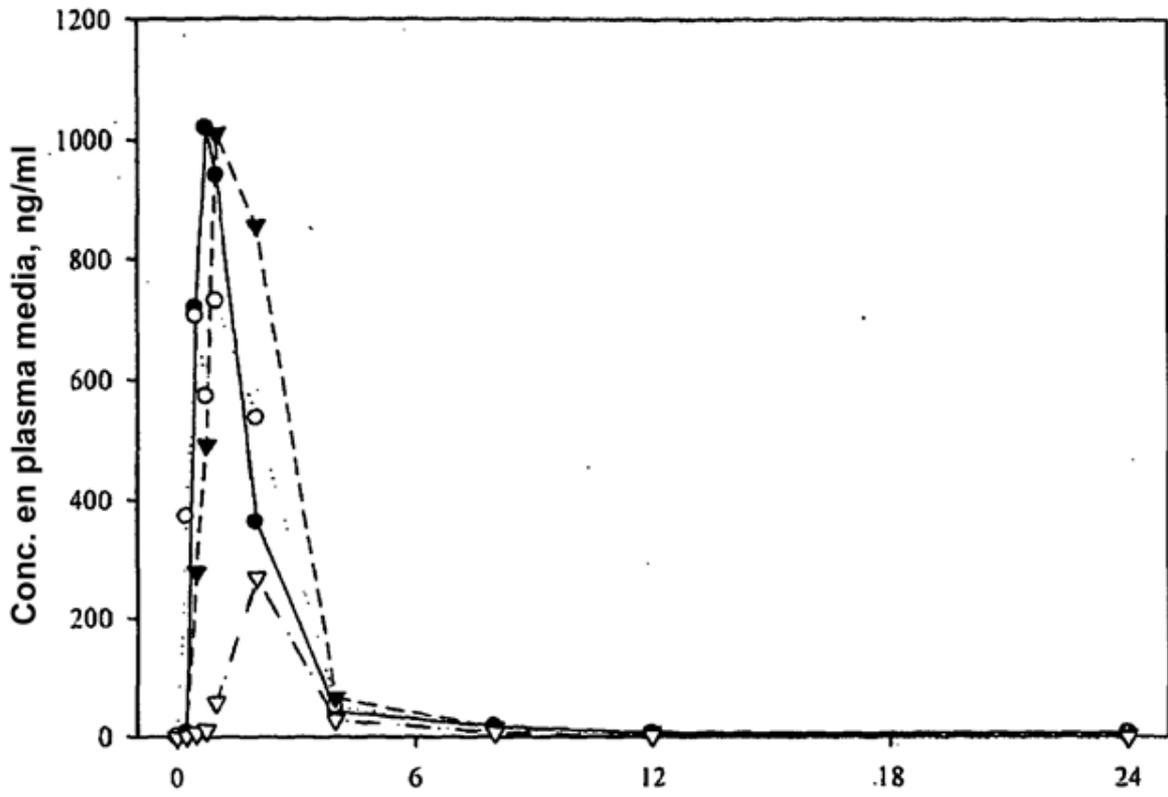


Figura 11A

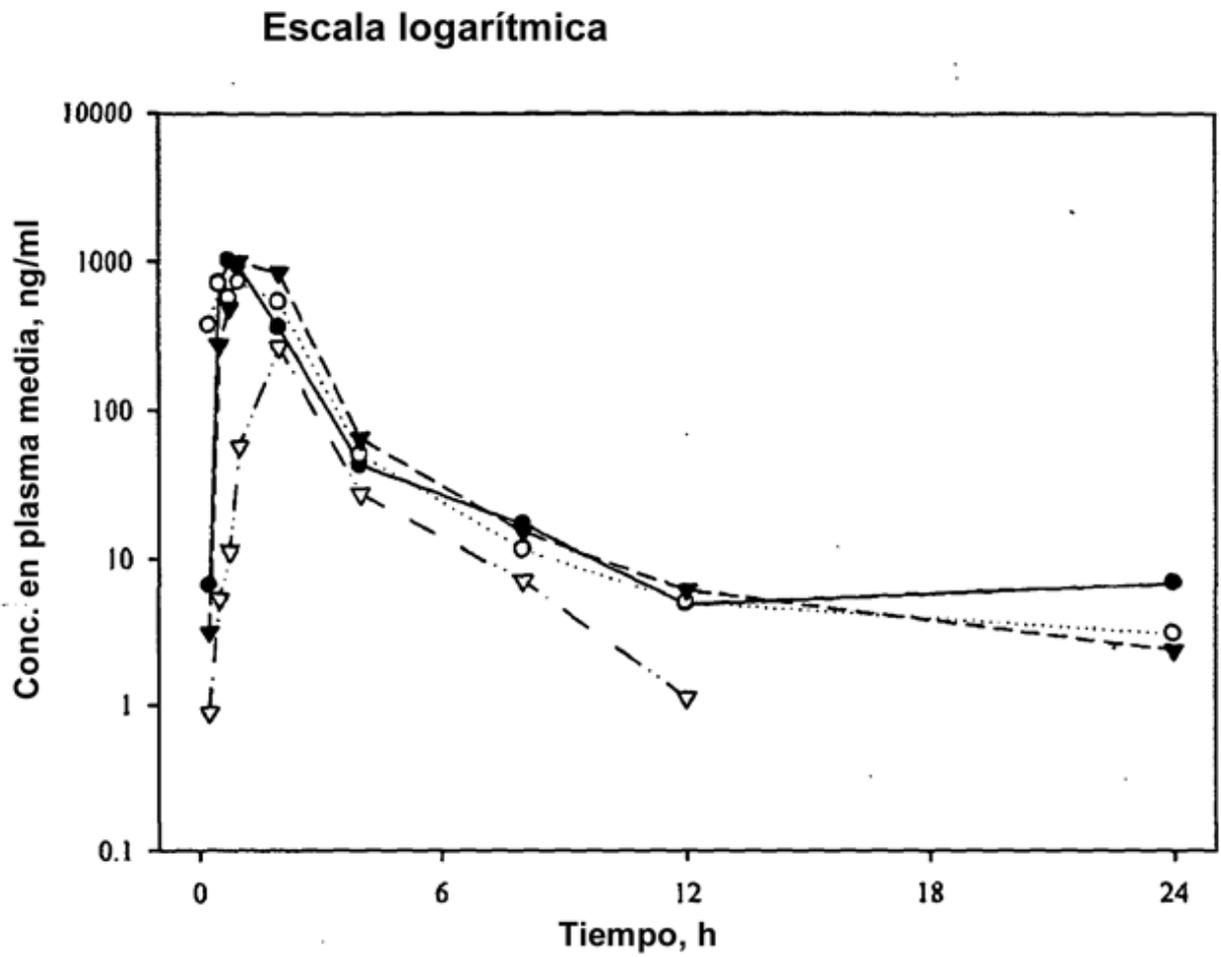
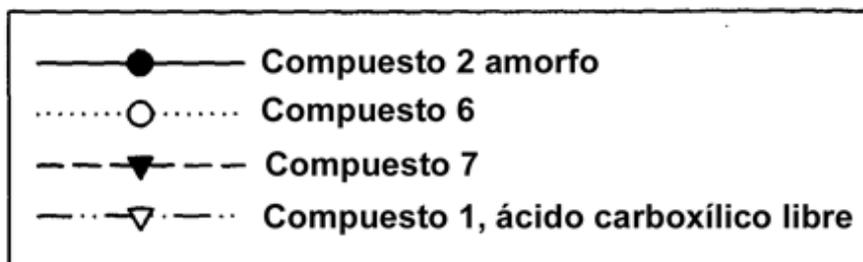
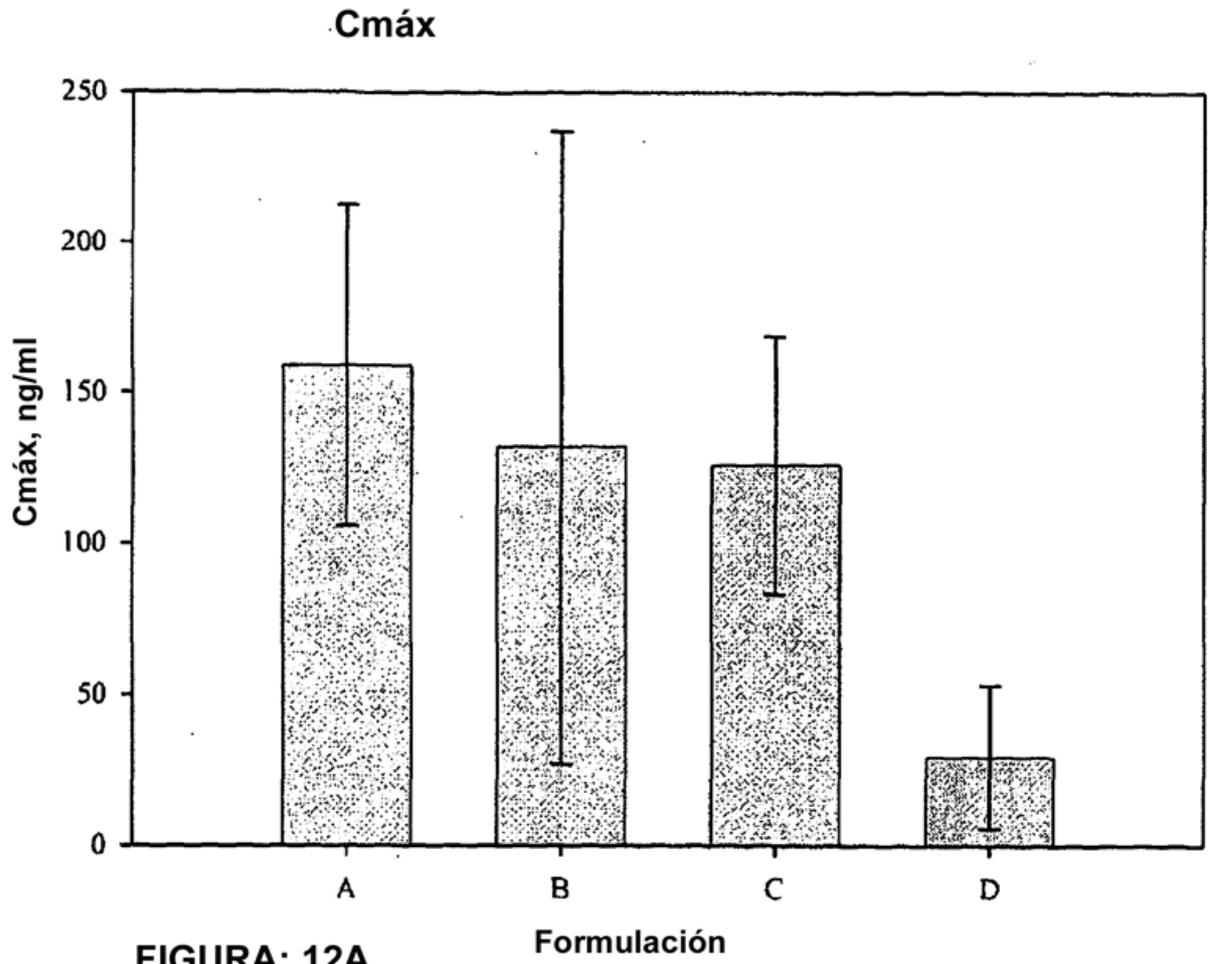
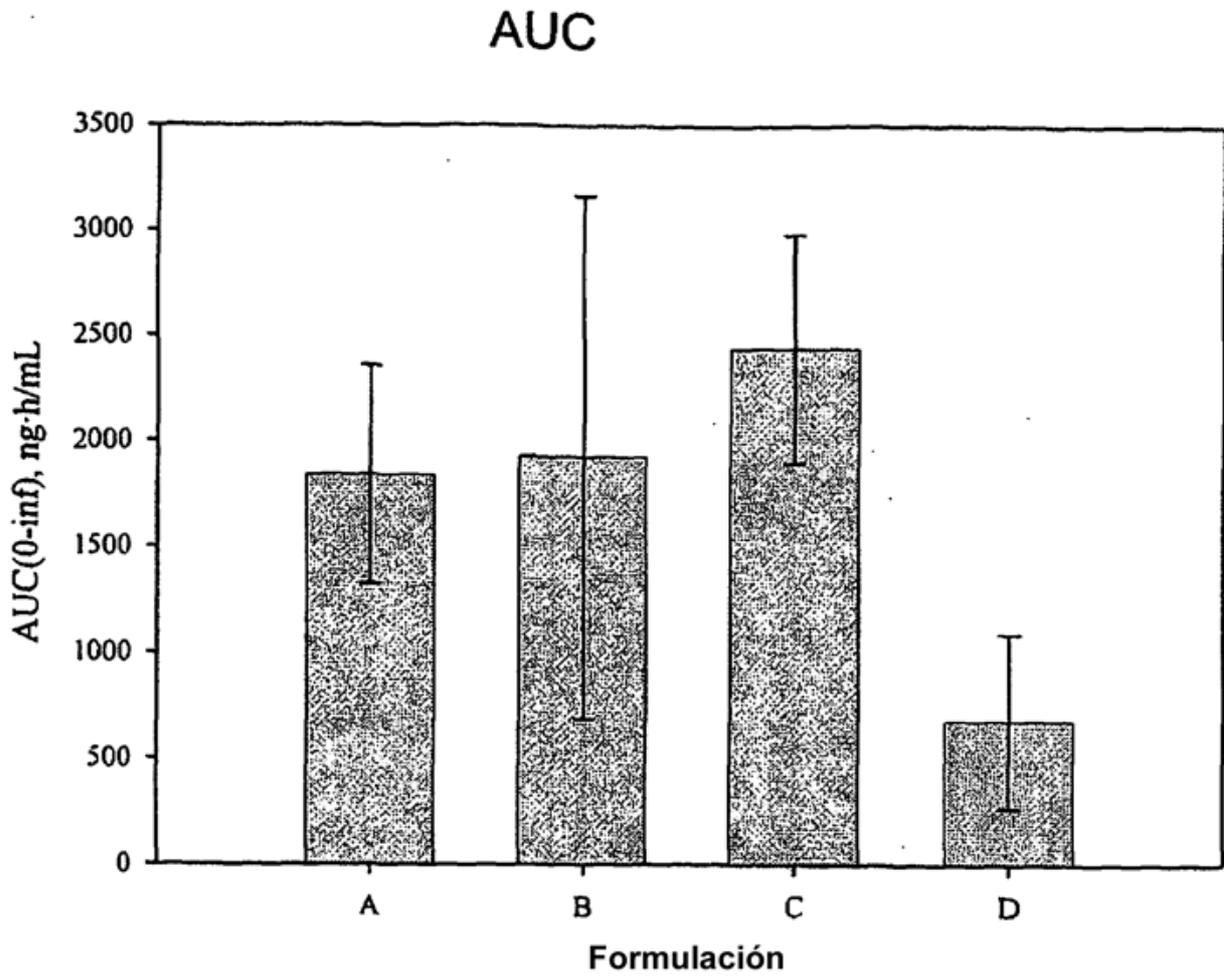


Figura 11B







**FIGURA: 12B**

- (A) Compuesto 2, sal de sodio amorfa**
- (B) Compuesto 6**
- (C) Compuesto 7**
- (D) Compuesto 1, ácido carboxílico libre**