

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 045**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 31/4152** (2006.01)

**C07D 231/22** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2010 PCT/EP2010/068256**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11064315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2010 E 10782303 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2503993**

54 Título: **Sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina**

30 Prioridad:

**25.11.2009 EP 09382261**  
**04.02.2010 EP 10382025**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2016**

73 Titular/es:

**LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (100.0%)**  
**Avda Mare de Déu de Montserrat 221**  
**08041 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**CUBERES-ALTISENT, MARÍA ROSA;**  
**SOLÀ - CARANDELL, LLUIS y**  
**GARCÍA - COUCEIRO, URKO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 589 045 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 de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina, a composiciones farmacéuticas que las comprenden, a su uso en la terapia y/o profilaxis de enfermedades asociadas a receptores sigma.

## ANTECEDENTES

10 La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos se ha visto ayudada en gran medida en los últimos años por una mejor comprensión de la estructura de las proteínas y otras biomoléculas asociadas con enfermedades diana. Una clase importante de estas proteínas es el receptor sigma ( $\sigma$ ), un receptor de superficie celular del sistema nervioso central (SNC) que puede estar relacionado con los efectos estimulantes disfóricos, alucinógenos y cardiacos de los opioides. A partir de estudios de la biología y función de receptores sigma, se han presentado pruebas de que los ligandos de receptores sigma pueden ser útiles en el tratamiento de psicosis y trastornos del movimiento tales como distonía y discinesia tardía, y alteraciones motoras asociadas con corea de Huntington o síndrome de Tourette y en

15 enfermedad de Parkinson (Walker, J.M. y col., *Pharmacological Reviews*, 1990, 42, 355). Se ha notificado que el ligando de receptores sigma conocido, rimcazol, muestra clínicamente efectos en el tratamiento de psicosis (Snyder, S.H., Largent, B.L. J. *Neuropsychiatry* 1989, 1, 7). Los sitios de unión sigma tienen afinidad preferente por los isómeros dextrorrotatorios de ciertos benzomorfanos opiáceos, tales como (+)SKF 10047, (+)ciclazocina y (+)pentazocina y también por algunos narcolépticos tales como haloperidol.

20 El receptor sigma tiene al menos dos subtipos, que pueden diferenciarse por isómeros estereoselectivos de estos fármacos farmacóactivos. SKF 10047 tiene afinidad nanomolar por el sitio sigma 1 ( $\sigma$ -1), y tiene afinidad micromolar por el sitio sigma 2 ( $\sigma$ -2). El haloperidol tiene afinidades similares por ambos subtipos. No se conocen ligandos sigma endógenos, aunque se ha sugerido que la progesterona es uno de ellos. Los posibles efectos farmacológicos mediados por sitios sigma incluyen modulación de la función de receptores de glutamato, respuesta de

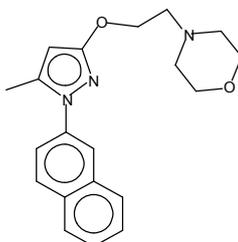
25 neurotransmisores, neuroprotección, comportamiento y cognición (Quirion, R. y col., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1992, 13:85-86). La mayoría de los estudios han implicado que los sitios de unión (receptores) son elementos plasmalémicos de la cascada de transducción de señales. Se han evaluado como antipsicóticos fármacos que se ha notificado que son ligandos sigma selectivos (Hanner, M. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93:8072-8077). La existencia de receptores sigma en el SNC, sistemas inmunitario y endocrino ha sugerido la posibilidad de que

30 puedan servir como vínculo entre los tres sistemas.

En vista de las posibles aplicaciones terapéuticas de agonistas o antagonistas del receptor sigma, se ha dirigido un gran esfuerzo a encontrar ligandos selectivos. Por tanto, la técnica anterior da a conocer diferentes ligandos de receptores sigma. La 4-[2-[[5-Metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina es uno de tales ligandos de

35 receptores sigma prometedores. El compuesto y su síntesis se dan a conocer y se reivindican en el documento WO 2006/021462.

La 4-[2-[[5-Metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina es un antagonista del receptor sigma-1 ( $\sigma$ -1) sumamente selectivo. Ha presentado una fuerte actividad analgésica en el tratamiento y la prevención del dolor agudo y crónico y, particularmente, dolor neuropático. El compuesto tiene un peso molecular de 337,42 uma. La fórmula estructural del compuesto es:



40 Para llevar a cabo su desarrollo farmacéutico y descubrir su potencial, hay una necesidad en la técnica de formas adicionales de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina que facilitarán la preparación de mejores formulaciones de su principio farmacéutico activo. Además, nuevas formas del compuesto también pueden mejorar sus características de producción, manejo y almacenamiento y sus efectos terapéuticos tales como propiedades

45 farmacológicas.

En este sentido, formas alternativas del compuesto pueden tener propiedades ampliamente diferentes tales como, por ejemplo, estabilidad termodinámica potenciada, pureza superior o biodisponibilidad mejorada (por ejemplo, mejor absorción, patrones de disolución). Formas de compuestos específicos podrían facilitar también la fabricación (por ejemplo, capacidad de flujo potenciada), el manejo y el almacenamiento (por ejemplo no higroscópico, vida útil de almacenamiento larga) de las formulaciones de compuestos o permitir el uso de una dosis inferior del agente terapéutico, disminuyendo así sus posibles efectos secundarios. Por tanto, es importante proporcionar tales formas, que tengan propiedades deseables para uso farmacéutico.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención, tras una extensa investigación de diferentes formas de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina (denominada en el presente documento "compuesto 63"), han encontrado y demostrado sorprendentemente que su sal de clorhidrato proporciona propiedades de producción, manejo, almacenamiento y/o terapéuticas ventajosas.

Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a la sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina (denominada en el presente documento "P027" o "ejemplo 1").

Otras sales del compuesto 63 seleccionadas del grupo que consiste en etanosulfonato, fumarato, malato, maleato, malonato y metanosulfonato se divulgan con fines de referencia.

El compuesto P027 tiene un peso molecular de 373,88 uma, una pKa de 6,73 y un punto de fusión de 194,2 °C. El compuesto es muy soluble en agua y fácilmente soluble en metanol, ácido clorhídrico 1 N y dimetilsulfóxido. Es soluble con moderación en etanol, ligeramente soluble en acetona y prácticamente insoluble en acetato de etilo y en hidróxido de sodio 1 N. El producto presenta un mejor perfil de absorción y disolución *in vivo* que su base relacionada.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de la sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina que comprende:

- a) mezclar 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina y una disolución que contiene ácido clorhídrico, y
- b) aislar la sal de clorhidrato resultante.

Un aspecto adicional de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina y un excipiente, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional la invención se refiere a clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina para su uso como medicamento, preferiblemente como ligando sigma, es decir, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección o una enfermedad mediada por receptores sigma.

Estos aspectos y realizaciones preferidas de los mismos se definen también adicionalmente en las reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura Nº 1:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 1

**Figura Nº 2:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 1

**Figura Nº 3:** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 1

**Figura Nº 4:** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del compuesto 63

**Figura Nº 5:** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 2

**Figura Nº 6:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 2

**Figura Nº 7:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 2

**Figura Nº 8:** Análisis FTIR del ejemplo 2

**Figura Nº 9:** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 3

**Figura Nº 10:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 3

**Figura Nº 11:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 3

**Figura Nº 12:** Análisis FTIR del ejemplo 3

**Figura N° 13** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 4

**Figura N° 14:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 4

**Figura N° 15:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 4

**Figura N° 16:** Análisis FTIR del ejemplo 4

5 **Figura N° 17** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 5

**Figura N° 18:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 5

**Figura N° 19:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 5

**Figura N° 20:** Análisis FTIR del ejemplo 5

**Figura N° 21:** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 6

10 **Figura N° 22:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 6

**Figura N° 23:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 6

**Figura N° 24:** Análisis FTIR del ejemplo 6

**Figura N° 25:** Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H) del ejemplo 7

**Figura N° 26:** Calorimetría diferencial de barrido (CDB) del ejemplo 7

15 **Figura N° 27:** Termogravimetría (TGA) del ejemplo 7

**Figura N° 28:** Análisis FTIR del ejemplo 7

**Figura N° 29:** Solubilidad termodinámica para el ejemplo 1. Curva de calibración.

**Figura N° 30:** Concentración plasmática del ejemplo 1 en rata.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Los inventores han encontrado que el compuesto P027, que es la sal de HCl de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina, tiene ventajas debido al hecho, entre otros, de que es un sólido cristalino, lo que simplifica su aislamiento, purificación y manejo.

De hecho, tras una extensa selección de sales, los inventores han observado que un gran número de ácidos (por ejemplo ácido sulfúrico o ácido L-tartárico) no proporcionan un sólido cuando se mezclan con la 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina sino un aceite. Además, entre los ácidos adecuados para obtener una sal en forma sólida, el ácido clorhídrico era el que proporcionaba los mejores resultados en cuanto a su facilidad de preparación, estabilidad física, aumento a escala, solubilidad, etc.

Por tanto, la presente invención se refiere al clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina (P027).

30 La sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina puede prepararse añadiendo una disolución de ácido clorhídrico a su base correspondiente disuelta en el disolvente apropiado. En una realización particular, el compuesto P027 puede obtenerse convenientemente disolviendo el compuesto de base libre en etanol saturado con HCl.

Tal como se indicó anteriormente, se ha notificado que 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina es un antagonista del receptor sigma-1 ( $\sigma$ -1) sumamente selectivo, presentando una fuerte actividad analgésica en el tratamiento y la prevención del dolor agudo y crónico y, particularmente, dolor neuropático (véase el documento WO 2006/021462). Se ha encontrado ahora que la sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina es particularmente adecuada para su uso como medicamento. Por tanto, la presente invención proporciona además medicamentos o composiciones farmacéuticas que comprenden clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina junto con un excipiente, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su administración a un paciente.

Más particularmente, el compuesto P027 es útil en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección o una enfermedad mediada por receptores sigma.

45 En una realización más preferida, el compuesto P027 se usa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diarrea; trastornos

lipoproteicos; migraña; obesidad; artritis; hipertensión; arritmia; úlcera; déficits de aprendizaje, memoria y atención; trastornos de la cognición; enfermedades neurodegenerativas; enfermedades desmielinizantes; adición a fármacos y sustancias químicas incluyendo cocaína, anfetamina, etanol y nicotina; discinesia tardía; accidente cerebrovascular isquémico; epilepsia; accidente cerebrovascular; estrés; cáncer; estados psicóticos, en particular depresión, ansiedad o esquizofrenia; inflamación; o enfermedades autoinmunitarias.

Los aditivos o materiales auxiliares de una composición farmacéutica según la presente invención pueden seleccionarse entre vehículos, excipientes, materiales de soporte, lubricantes, cargas, disolventes, diluyentes, colorantes, acondicionadores del sabor tales como azúcares, antioxidantes, aglutinantes, adhesivos, disgregantes, antiadherentes, deslizantes y/o aglutinantes. En el caso de supositorios, esto puede implicar ceras o ésteres de ácidos grasos o conservantes, emulsionantes y/o vehículos para administración parenteral. La selección de estos aditivos y/o materiales auxiliares y las cantidades que van a usarse dependerán de la forma de administración de la composición farmacéutica.

El medicamento o la composición farmacéutica según la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para su administración a seres humanos y/o animales, preferiblemente seres humanos incluyendo lactantes, niños y adultos y puede producirse mediante procedimientos convencionales conocidos para el experto en la técnica. Por tanto, la formulación según la invención puede adaptarse para administración tópica o sistémica, particularmente para las vías dérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intravesical, intraósea, intracavernosa, pulmonar, bucal, sublingual, ocular, intravítrea, intranasal, percutánea, rectal, vaginal, oral, epidural, intratecal, intraventricular, intracerebral, intracerebroventricular, intracisternal, intraespinal, periespinal, administración mediante agujas o catéteres con o sin dispositivos de bomba u otras vías de administración.

Las formulaciones mencionadas se prepararán usando procedimientos convencionales tales como los descritos o a los que se hace referencia en las farmacopeas española y estadounidense y textos de referencia similares.

En una realización de la invención, se prefiere que el compuesto P027 se use en cantidades terapéuticamente eficaces. El médico determinará la dosificación del presente agente terapéutico que será la más adecuada y variará con la forma de administración y el compuesto particular elegido y, además, variará con el paciente en tratamiento, la edad del paciente, el tipo de enfermedad o afección que está tratándose. Cuando la composición se administra por vía oral, se requerirán mayores cantidades del agente activo para producir el mismo efecto que una cantidad más pequeña administrada por vía parenteral. El compuesto es útil de la misma manera que agentes terapéuticos comparables y el nivel de dosificación es del mismo orden de magnitud que se emplea generalmente con estos otros agentes terapéuticos. Este compuesto activo se administrará normalmente una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de desde 0,1 hasta 1000 mg/kg/día.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de ciertas realizaciones de la invención y no pueden considerarse como restrictivos de ningún modo.

### 35 **EJEMPLOS**

#### Técnicas analíticas

Se han usado las siguientes técnicas en esta invención para identificar las diferentes sales del compuesto 63 obtenidas:

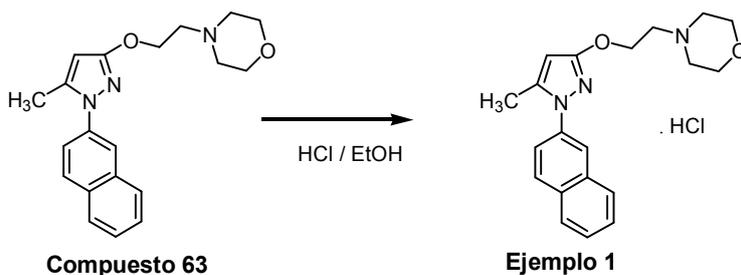
- Análisis de calorimetría diferencial de barrido (CDB)
- 40 Se registraron los análisis de CDB en un instrumento Mettler Toledo DSC822e. Se pesaron muestras de 1-2 mg en crisoles de aluminio de 40 µl con una tapa perforada, y se calentaron, en atmósfera de nitrógeno (50 ml/min), de desde 30 hasta 300 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Se realizaron la evaluación y la recogida de datos con el programa informático STARe.
- Análisis termogravimétrico (TGA)
- 45 Se registraron los análisis termogravimétricos en un instrumento Mettler Toledo SDTA851e. Se pesaron muestras de 3 - 4 mg (usando una microescala MX5, Mettler) en crisoles de aluminio de 40 µl abiertos, y se calentaron a 10 °C/min entre 30 y 300 °C, en atmósfera de nitrógeno (80 ml/min). Se realizaron la evaluación y la recogida de datos con el programa informático STARe.
- Resonancia magnética nuclear de protón (RMN de <sup>1</sup>H)
- 50 Se registraron los análisis de resonancia magnética nuclear de protón en metanol o cloroformo deuterado en un espectrómetro de RMN Bruker Avance 400 Ultrashield, equipado con una sonda de BBO de 5 mm con gradiente en z (Broadband Observe) con ATM y un automuestreador BACS-120 automático. Se registraron espectros resolviendo 2 – 10 mg de muestra en 0,7 ml de disolvente deuterado.

- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se registraron los espectros de FTIR usando un instrumento Bruker Tensor 27, equipado con un sistema ATR de reflexión única MKII Golden Gate, una fuente de infrarrojo medio como fuente de excitación y un detector DTGS. Se registraron los espectros en 32 barridos a una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. No se requirió preparación de las muestras para realizar el análisis.

5

**Ejemplo 1. Síntesis de 4-{2-[5-metil-1-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-3-ilo]etil} morfolina (compuesto 63) y su sal de clorhidrato (ejemplo 1)**



El compuesto 63 puede prepararse tal como se da a conocer en la solicitud previa WO2006/021462. Su clorhidrato puede obtenerse según el siguiente procedimiento:

10

Se disolvió el compuesto 63 (6,39 g) en etanol saturado con HCl, entonces se agitó la mezcla durante algunos minutos y se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en isopropanol. Las aguas madre de la primera cristalización proporcionaron una segunda cristalización mediante concentración. Ambas cristalizaciones tomadas juntas produjeron 5,24 g (63 %) de la sal de clorhidrato correspondiente (p.f. = 197-199 °C).

15 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 10,85 (sa, 1H), 7,95 (m, 4H), 7,7 (dd, J=2,2, 8,8 Hz, 1H), 7,55 (m, 2H), 5,9 (s, 1H), 4,55 (m, 2H), 3,95 (m, 2H), 3,75 (m, 2H), 3,55-3,4 (m, 4H), 3,2 (m, 2H), 2,35 (s, 3H).

Pureza por HPLC: 99,8 %.

Con este procedimiento, se obtiene la sal de clorhidrato como un sólido cristalino con un rendimiento muy bueno. Además, su alto punto de fusión es particularmente conveniente desde un punto de vista farmacéutico puesto que implica que el producto muestre una buena estabilidad física.

20

*Extracción del compuesto 63 a partir de su sal de clorhidrato (ejemplo 1)*

La muestra usada en esta invención es el ejemplo 1. Se extrajo la base (compuesto 63) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a partir de una disolución acuosa básica (pH > 10, usando una disolución acuosa 0,5 M de NaOH) del ejemplo 1, produciendo un aceite naranja.

25

**Procedimiento general para cristalizar otras sales del compuesto 63**

Se prepararon sales mezclando inicialmente 1 ml de una disolución 0,107 M del compuesto 63, como el aceite naranja obtenido anteriormente (véase el ejemplo 1), en metanol con 1 ml de una disolución 0,107 M del contraión correspondiente en metanol. Se agitaron las mezclas durante una hora y se evaporó el disolvente a vacío (Genevac, 8 mm de Hg), obteniendo aceite o un sólido blando dependiendo de la sal.

30

Se disolvió el producto obtenido en la preparación inicial en la cantidad mínima de disolvente de cristalización a su temperatura de ebullición o a un máximo de 75 °C. Si tras la adición de 4 ml de disolvente la sal no se disolvía completamente, se agitó la suspensión a alta temperatura durante 30 minutos y se separó el residuo mediante centrifugación o filtración en caliente. Se enfriaron las aguas madre hasta temperatura ambiente y se mantuvieron durante 24 horas.

35

Cuando se formaba un sólido, se separó (filtración o centrifugación). Si no, se mantuvo la disolución en el refrigerador (4 °C) durante unos cuantos días. Si se formaba un sólido, se separó de la disolución. Si no, se mantuvo la disolución en el congelador (-21 °C) durante unos cuantos días. Si se formaba un sólido, se separó de la disolución. En el caso de que tras todas estas manipulaciones no se obtuviese un sólido, se dejó evaporar la disolución hasta sequedad.

40

Se secaron todos los sólidos obtenidos en el horno de secado a vacío a 40 °C (10 mm de Hg) durante 4 horas y, si estaba disponible suficiente cantidad, se analizaron. Se hizo la caracterización inicial mediante RMN de <sup>1</sup>H para confirmar la síntesis de la sal. Los disolventes usados en la presente invención se enumeran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Disolventes usados en la presente invención

Nombre	Código	Temperatura de ebullición ( °C)	Punto de fusión ( °C)	Constante dieléctrica
Acetona	ACE	56	-94	20,7
Acetonitrilo	ACN	81	-46	38,8
Acetato de etilo	AET	77	-84	6
Cloroformo	CLF	61	-63	4,8
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	DMF	153	-98	36,7
Etanol	EOH	78	-114	24,6
Isopropanol	IPH	82	-90	19,9
Metanol	MOH	65	-98	32,7
Tetrahidrofurano	THF	66	-108	20,4
Carbonato de dimetilo	CDM	90	3	3,1
Agua	H2O	100	0	80
2-Butanol	BUL	98	-115	16,6
Metil <i>terc</i> -butil éter	MTE	55	-109	2,6
Diisopropil éter	DIE	68	-86	3,9
Acetato de isobutilo	AIB	117	-99	5
Clorobenceno	CLB	132	-45	5,6
Ciclohexano	CHE	81	6	2,2
3-Pentanona	POA	102	-40	17
Tolueno	TOL	110	-93	7,6

5

Se seleccionaron los ácidos usados para investigar las sales cristalinas del compuesto 63 según los siguientes criterios (tabla 2):

- Ácidos con una pKa al menos tres unidades inferior que el compuesto 63 (pKa de 6,7)
- Ácidos que son compuestos farmacéuticamente aceptables

10 Aunque varios de los ácidos seleccionados tienen dos o incluso tres posiciones ácidas (ácido cítrico), en principio, solo el ácido sulfúrico tiene un segundo protón ácido suficiente para formar la disal con el compuesto 63. De este modo, hay en total once sales diferentes que podrían formarse.

**Tabla 2.** Ácidos seleccionados usados como contraiones.

Ácido	Código	Pureza (%)	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>
Ácido sulfúrico	SFT	95-97	-3	1,9	–
Ácido metanosulfónico	MSF	99,5	-1,2	–	–
Ácido etanosulfónico	ESF	95,0	2,05	–	–
Ácido fumárico	FMT	99,5	3,03	4,38	–
Ácido L(-)-málico	LML	99,5	3,46	5,10	–
Ácido malónico	MLO	99,0	2,83	5,70	–
Ácido maleico	MLE	99,0	1,92	6,23	–
Ácido cítrico	CTR	99,5	3,13	4,76	6,40
Ácido glicólico	GLY	99,0	3,82	–	–
Ácido L-(+)-tartárico	LTT	99,5	3,02	4,36	–

La estrategia general realizada para estudiar las sales cristalinas del compuesto 63 puede dividirse en tres etapas:

- Etapa 1: Selección de la cristalización de la sal
- 5 - Etapa 2: Caracterización y optimización de la sal
- Etapa 3: Preparación a gran escala de sales seleccionadas

Inicialmente, se realizó una selección de la cristalización usando los contraiones seleccionados mostrados en la tabla 2, para buscar sales cristalinas prometedoras. Se realizó la selección a una escala pequeña (40 mg de compuesto 63), usando una gran gama de disolventes de cristalización (tabla 1) y diferentes metodologías de cristalización. En la selección, no se monitorizaron estrictamente las condiciones de cristalización, y los sólidos obtenidos se caracterizaron mediante RMN de <sup>1</sup>H. La espectroscopía de RMN proporciona una buena indicación de la formación de sal, puesto que el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de la sal difiere sustancialmente del de la mezcla de ácido y base. Se observa un desplazamiento claro de las señales asociadas con los hidrógenos cercanos al nitrógeno protonado. Además, cuando el contraión ácido tiene señales características en la RMN de <sup>1</sup>H, estas pueden identificarse, permitiendo determinar la estequiometría de la sal y tener una idea cualitativa de la pureza de la sal.

En una segunda etapa, todas las sales cristalinas se aumentaron a escala a una escala de 100-500 mg en los disolventes que dieron el mejor resultado en el procedimiento de selección. Además, se usó una metodología de cristalización apropiada para la producción industrial. Las sales obtenidas se caracterizaron completamente mediante RMN de <sup>1</sup>H, CDB, TGA y FTIR. El objetivo de esta etapa era, en primer lugar, diseñar un procedimiento que pudiese aumentarse a escala para preparar las sales seleccionadas con un rendimiento optimizado, y en segundo lugar caracterizarlas completamente.

Finalmente, se preparó un grupo de sales cristalinas seleccionadas con propiedades de estado sólido adecuadas (cristalinidad y estabilidad térmica) a una escala de 2-3 g partiendo del compuesto 63.

#### **Desde la selección de la cristalización de la sal hasta la preparación a gran escala (etapas 1-3)**

Inicialmente, se realizó una selección de la cristalización del compuesto 63 con los diez contraiones representados en la tabla 2, a una escala de 40 mg, en los siguientes diez disolventes: acetona, acetato de etilo, cloroformo, *N,N*-dimetilformamida, metanol, etanol, isopropanol, 2-butanol, acetonitrilo y tetrahidrofuran. El procedimiento comenzó con la preparación de mezclas equimolares, a partir de disoluciones en metanol de concentración conocida, del compuesto 63 y los diferentes contraiones ácidos. El producto bruto resultante, tras la evaporación del metanol, se cristalizó en los disolventes calientes mencionados anteriormente. Se usaron diferentes estrategias de cristalización dependiendo de la solubilidad de cada mezcla de ácido y compuesto 63, y por tanto se obtuvieron los sólidos usando diferentes procedimientos. Para algunos ácidos, la mezcla no era soluble en el disolvente de cristalización caliente, obteniendo un sólido en suspensión. En otros casos, el sólido cristalizó durante el enfriamiento hasta temperatura ambiente de la disolución, o tras varios días a 4 °C o a -18 °C. Finalmente, en algunos intentos de cristalización, se obtuvo el sólido tras una lenta evaporación del disolvente a temperatura ambiente. En varios casos, se obtuvo más de un sólido por intento de cristalización.

A partir de esta primera selección de la cristalización (tabla 3), podían extraerse las siguientes observaciones:

- Se obtuvieron sales cristalinas del compuesto 63 con ácidos fumárico y maleico en la mayoría de los disolventes sometidos a ensayo. Para ambos contraiones ácidos, se obtuvieron varios sólidos cristalinos incluyendo solvatos. Todos los sólidos correspondían a la sal quimolecular.
- 5 - La mezcla equimolar de compuesto 63 y ácido cítrico era muy soluble en la gran mayoría de disolventes sometidos a ensayo. Por tanto, la mayoría de los sólidos se obtuvieron tras una evaporación completa del disolvente. Además, los sólidos obtenidos eran de baja cristalinidad o contenían cantidades apreciables de disolventes residuales. Lo más probablemente, los sólidos de baja cristalinidad provenían de solvatos desolvatados.
- 10 - La mezcla equimolar de compuesto 63 y ácido glicólico era muy soluble en la gran mayoría de disolventes sometidos a ensayo. Por tanto, la mayoría de los sólidos se obtuvieron tras una evaporación completa del disolvente, y varios eran mezclas de sólidos.
- Se obtuvieron sales cristalinas del compuesto 63 con ácidos etanosulfónico, L-málico y malónico solo en uno o dos de los disolventes sometidos a ensayo en condiciones muy concentradas. La mayoría de los sólidos se  
15 obtuvieron tras una evaporación completa del disolvente
- No se obtuvieron sólidos cristalinos del compuesto 63 con ácidos sulfúrico, metanosulfónico y L-tartárico. Las mezclas de ácido y base eran muy solubles en todos los disolventes sometidos a ensayo y se obtuvieron o bien aceites o bien un sólido no cristalino tras la evaporación completa del disolvente.

Tabla 3. Resultados de la primera selección de la cristalización con los diez contraiones ácidos

Contraión ácido/disolvente	ACE	AET	CLF	DMF	MOH	EOH	IPH	BUL	ACN	THF
Ácido sulfúrico (SFT)	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite
Ácido metanosulfónico (MSF)	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite
Ácido etanosulfónico (ESF)	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	S1	Aceite
Ácido fumárico (FMT)	S1 (Solvato)	S6 (Solvato)	ácido	Aceite	S3	S5	S3	S3	S3+S5	s4 (Solvato)
	S2									
Ácido L-málico (LML)	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	S1	Aceite	S1	Aceite
Ácido maleico (MLE)	S1	S1	S2	S4	S1	S1	S1	S1	S4	S3 (Solvato)
Ácido malónico (MLO)	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	S1	Aceite	Aceite	Aceite
Ácido cítrico (CTR)	S1	S1	s2 (Solvato)	Aceite	s3	s3	S4 (Solvato)	Aceite	s3	Aceite
Ácido glicólico (GLY)	S1	S1+S2	S1+S2	S1	S1	S3 (Solvato)	S1+S2	S1+S2	S1	S1+S2
Ácido L-tartárico (LTT)	Aceite	No-c	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite

\* S: sólido cristalino; s: sólido de baja cristalinidad; No-c: no cristalino

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó una segunda selección de cristalización en nueve disolventes adicionales. Se seleccionaron disolventes menos polares (acetato de isobutilo, carbonato de dimetilo, clorobenceno, ciclohexano, 3-pentanona, tolueno, metil-terc-butil-éter, diisopropil-éter) y agua con el fin de disminuir la solubilidad de las sales (tabla 4).

5 **Tabla 4.** Resultados de la segunda selección de la cristalización con nueve contraiones ácidos

<b>Sal seleccionada como objetivo / disolvente</b>	<b>DIE</b>	<b>MTE</b>	<b>H2O</b>	<b>AIB</b>	<b>CDM</b>	<b>CLB</b>	<b>CHE</b>	<b>POA</b>	<b>TOL</b>
Ácido sulfúrico (SFT)	Aceite								
Ácido etanosulfónico (ESF)	Aceite	S2	Aceite	S2	Aceite	Aceite	Aceite	Aceite	S2
Ácido metanosulfónico (MSF)	Aceite	S1							
Ácido málico (LML)	Aceite	S1	Aceite						
Ácido malónico (MLO)	Aceite	S1	Aceite						
Ácido cítrico (CTR)	Aceite	S1	Aceite						
Ácido glicólico (GLY)	S2	S1+S2	Aceite	S1+S2	S1	S1	S1+S2	S1	S1+S2
Ácido tartárico (LTT)	Aceite								

A partir de esta segunda selección de la cristalización, podían extraerse las siguientes observaciones:

- 10 - Aunque la mezcla equimolar de compuesto 63 y ácido glicólico era menos soluble en este segundo conjunto de disolventes, el comportamiento era muy similar al primer conjunto de cristalizaciones. Se obtuvieron varios sólidos correspondientes a mezclas de sólidos. El sólido 1 se generó solo tras una evaporación completa del disolvente y no pudo caracterizarse completamente.
- Se obtuvieron sales cristalinas del compuesto 63 con ácidos L-málico, malónico y cítrico solo en un disolvente, produciendo un sólido ya conocido.
- 15 - Se obtuvieron sales cristalinas del compuesto 63 con ácido etanosulfónico en varios disolventes, produciendo, en todos los casos, un nuevo sólido diferente de la selección de la cristalización inicial.
- Pudo obtenerse en tolueno un sólido correspondiente a una sal cristalina del compuesto 63 con ácido metanosulfónico.
- No se obtuvieron sólidos cristalinos del compuesto 63 con ácidos sulfúrico y L-tartárico en este segundo conjunto de disolventes.
- 20 Teniendo en cuenta los resultados de las dos selecciones de la cristalización descritas, se optimiza la generación de las sales no solvatadas mejor caracterizadas del compuesto 63 con ácidos fumarico, maleico, metanosulfónico, etanosulfónico, L-málico y malónico. Se realizaron experimentos de aumento a escala de optimización partiendo de 100 mg de compuesto 63. Se optimizó también el procedimiento de aumento a escala para las sales con ácidos fumárico, maleico, metanosulfónico, etanosulfónico, L-málico y malónico.

Finalmente, se aumentó a escala la preparación de las sales para los seis contraiones seleccionados a 2-3 g y se caracterizaron completamente. El procedimiento global de esta invención se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 5.** Resumen de las cristalizaciones realizadas con sales cristalinas del compuesto 63.

<b>Selección de la cristalización</b>	<b>190 cristalizaciones</b>
Ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido L-(-)-málico, ácido malónico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido glicólico, ácido L-(+)-tartárico	Escala de 40 mg
<b>Caracterización y optimización de sólidos cristalinos</b>	<b>23 cristalizaciones</b>
Ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido L-(-)-málico, ácido malónico, ácido maleico	Escala de 100-500 mg
<b>Preparación a gran escala de sales seleccionadas</b>	<b>6 cristalizaciones</b>
Ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido L-(-)-málico, ácido malónico, ácido maleico	Escala de 2,5 g

#### 5 Ejemplo 2: preparación de la sal de fumarato del compuesto 63

(referencia)

Durante la selección inicial, se intentó la cristalización de la sal de fumarato en 10 disolventes diferentes. Se obtuvieron sólidos cristalinos correspondientes a la sal en todos los disolventes, excepto DMF y cloroformo, usando diferentes técnicas de cristalización: suspensión, enfriamiento de una disolución saturada o tras la evaporación completa del disolvente. En cloroformo, se recuperó el ácido inicial, mientras que en DMF se separó la sal como un aceite naranja. Se obtuvieron dos sólidos no solvatados, el primero en metanol, isopropanol y butanol, y el segundo solo en etanol. Finalmente, se obtuvieron solvatos en acetona, acetato de etilo y THF, y se generó una mezcla de los dos sólidos en acetonitrilo.

Se eligió un sólido cristalino no solvatado, en principio cualquiera de los obtenidos en la selección, para el aumento a escala. Inicialmente, se intentó el aumento a escala en acetonitrilo, puesto que era el disolvente que producía un producto cristalino en el que la sal era menos soluble. Aunque la sal se obtuvo en un rendimiento muy bueno (83 %), el proceso no era óptimo para el aumento a escala puesto que el ácido no es soluble en acetonitrilo y la sal final precipitó a partir de una mezcla de compuesto 63 como un aceite y ácido fumárico como un sólido, ambos suspendido en el disolvente. Se intentó entonces la cristalización en etanol para generar el sólido puro S5. De manera muy decepcionante, en el aumento a escala en etanol, se generó un nuevo sólido escasamente cristalino en bajo rendimiento. Finalmente, se realizó la cristalización en acetonitrilo, añadiendo el ácido disuelto en un alcohol (etanol o isopropanol). Se obtienen resultados ligeramente mejores cuando se disuelve ácido fumárico en etanol y se realiza la adición a temperatura ambiente (tabla 6). Por otro lado, se obtuvo una mezcla de fases cuando se mantuvo la suspensión a 4 °C durante dos días (tabla 6, entrada 4).

**Tabla 6:** Experimentos para aumentar a escala la sal de fumarato del compuesto 63

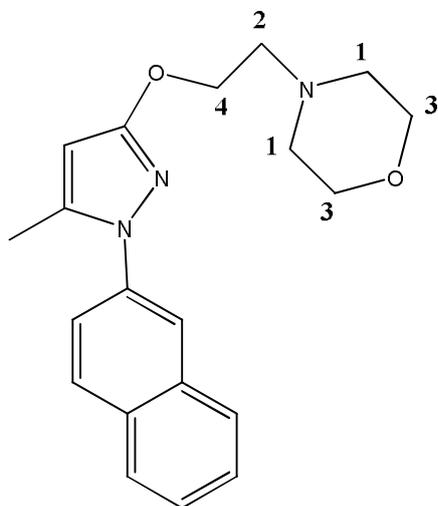
Entrada	Escala <sup>1</sup>	Disolvente 1 <sup>2</sup>	Disolvente 2 <sup>3</sup>	T <sub>1</sub> (°C) <sup>4</sup> / T <sub>2</sub> (°C) <sup>5</sup>	Rendimiento (%) <sup>6</sup>
1	200 mg	2 ml de ACN	0,8 ml de EtOH	70 / 25	49
2	500 mg	5 ml de ACN	2 ml de EtOH	25 / 25	59
3	200 mg	2 ml de ACN	1 ml de de IPH	25 / 25	55
4	2,5 g	20 ml de ACN	10 ml EtOH	25 / 4	58

1-) En referencia al ejemplo de partida 1. 2-) Disolvente usado para disolver el compuesto 63. 3-) Disolvente usado para disolver el ácido fumárico. 4-) Temperatura en la que se mezclan el ácido y la base. 5-) Temperatura a la que se recoge el sólido final. 6-) Se sembraron todos los experimentos .

El procedimiento experimental usado para preparar la sal de fumarato a una escala de 0,5 g (entrada 2 en la tabla 6) fue el siguiente:

- 5 *Se añade lentamente una disolución de ácido fumárico (153 mg, 1,32 mmoles) en 2 ml de etanol a una disolución de compuesto 63 (456 mg, 1,35 mmoles) en 5 ml de acetonitrilo a temperatura ambiente. Se siembra la disolución amarilla resultante y se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos. Precipita fácilmente un sólido blanco abundante. Se agita la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 15 horas. Se separa por filtración el sólido obtenido, se lava con 1 ml de acetonitrilo y se seca a vacío (10 mm de Hg) a 45 °C durante 6 horas para dar la sal de fumarato como un sólido blanco (350 mg, 59 %).*

- 10 La formación de las sales puede caracterizarse fácilmente mediante el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que cambia sustancialmente en comparación con la base libre. En el caso de la sal de fumarato, las señales procedentes de átomos de hidrógeno cercanos al nitrógeno básico (hidrógenos 1 y 2 en la fórmula a continuación) están claramente desplazadas a campo bajo (tabla 7). Pueden observarse también desplazamientos más pequeños en señales procedentes de átomos de hidrógeno lejos del nitrógeno (hidrógenos 3 y 4 en la fórmula a continuación). Además, la señal del fumarato aparece en el desplazamiento químico esperado ( $\delta$ : 6,72 ppm). Las integraciones de señales correspondientes al anión y al catión confirman inequívocamente que se forma la sal equimolecular, y no la disal (figura 5).



Fórmula molecular del compuesto 63 con indicación de hidrógenos que se desplazan en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tras formar la sal.

- 20 En análisis de CDB a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min presenta un pequeño pico endotérmico, seguido por un pequeño pico exotérmico y una señal endotérmica intensa (figura 6). La señal intensa con un comienzo a 142 °C corresponde a la temperatura de fusión del sólido S5. El pico pequeño con un comienzo a 131 °C corresponde a la fusión del sólido cristalino S3. Este pico es muy débil, lo más probablemente debido a que el sólido S3 se transforma parcialmente en el sólido S5 en el proceso de calentamiento del análisis de CDB. Por tanto, el pico
- 25 corresponde a la fusión del S3 restante dejado a la temperatura de fusión, que cristaliza fácilmente a S5 (pico exotérmico pequeño). El pico de fusión de muestras de sólido S3 esencialmente puras tiene diferentes intensidades dependiendo de la muestra específica. Lo más probablemente, la transición sólido-sólido de S3 a S5 tiene lugar en un grado diferente dependiendo del hábito de cristal y las dimensiones del cristal. Por tanto, muestras del sólido cristalino S3 puras mostrarán perfiles de CDB con una forma tal como se representa en la figura 6.
- 30 En el análisis de TG, se observan una pequeña pérdida de peso del 0,3 % a temperaturas de entre 120 y 150 °C y una drástica pérdida de peso que comienza a 190 °C debido a descomposición.

La caracterización de la sal de fumarato es la siguiente (figuras 5-8):

*RMN de  $^1\text{H}$*  (400 MHz, *d4*-metanol)  $\delta$ : 2,35 (s, 3H), 2,92-3,00 (m, 4H), 3,17 (t,  $J$  = 5 Hz, 2H), 3,80 (t,  $J$  = 5 Hz, 4H), 4,44 (t,  $J$  = 5 Hz, 2H), 5,83 (s, 1H), 6,72 (s, 2H), 7,52-7,62 (m, 3H), 7,89-7,96 (m, 3H), 8,00 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H).

- 35 *Disolventes residuales* de RMN de  $^1\text{H}$ : el 0,2 % p/p de acetonitrilo.

*FTIR (ATR)*  $\nu$ : 3435, 3148, 3037, 2943, 2855, 1876, 1731, 1664, 1650, 1559, 1509, 1488, 1446, 1394, 1372, 1314, 1236, 1186, 1166, 1133, 1098, 1081, 1047, 1014, 981, 932, 917, 859, 816, 787, 769 y 748  $\text{cm}^{-1}$ .

*CDB* (10 °C/min): Dos picos de fusión endotérmicos con un comienzo a 131 y 142 °C.

TGA (10 °C/min): Una pérdida de peso del 0,3 % entre 120 y 150 °C. El proceso de descomposición comienza a 190 °C.

### Ejemplo 3: (referencia) preparación de la sal de maleato del compuesto 63

5 Durante la selección inicial, se intentó la cristalización de la sal de maleato en 10 disolventes diferentes. La sal era muy soluble en todos los disolventes sometidos a ensayo. Se observaron solubilidades de entre 50 y 200 mg/ml, excepto para acetato de etilo, en el que la sal tenía una solubilidad de 20 mg/ml. Se obtuvieron sólidos cristalinos en todos los disolventes tras enfriar la disolución hasta temperatura ambiente o, para cloroformo, metanol y DMF, tras la evaporación completa del disolvente. Se detectaron cuatro sólidos diferentes. Se obtuvo una fase cristalina no solvatada en la mayoría de las cristalizaciones. Además, se generó un solvato en THF y se generaron otros dos sólidos no completamente caracterizados en tres de los experimentos.

15 Teniendo en cuenta el punto de ebullición y la cantidad de disolvente necesaria para la cristalización (66 mg/ml), isopropanol fue el disolvente elegido para el aumento a escala y la síntesis de la sal cristalina. Un intento inicial de enfriar una mezcla de ácido maleico y compuesto 63 en isopropanol desde 60 °C hasta temperatura ambiente produjo la sal como un aceite (tabla 7). Este aceite cristalizó tras agitar de nuevo la mezcla a 60 °C durante varias horas. Una metodología similar en condiciones más diluidas produjo la sal directamente como un sólido. Finalmente, se optimizó el procedimiento generando la precipitación directa de la sal tras añadir una disolución en isopropanol del ácido sobre una disolución en isopropanol del compuesto 63 a temperatura ambiente.

**Tabla 7.** Aumento a escala de la sal de maleato del compuesto 63

Escala <sup>1</sup>	Volumen isopropanol	de	Temperatura de adición	Rendimiento (%)	Observaciones
200 mg	1,5		60 °C	73	Separación de la sal como un aceite
200 mg	2,0		70 °C	77	Cristalización de la sal al enfriar
500 mg	6,0		20-25 °C	86	-
2,5 g	30,0		20-25 °C	96	-

<sup>1</sup> En referencia al ejemplo de partida 1.

20 El procedimiento experimental usado para preparar la sal de maleato a una escala de 2,5 g fue el siguiente:

25 *Se añade lentamente una disolución de ácido maleico (772 mg, 6,65 mmoles) en 15 ml de isopropanol a una disolución de compuesto 63 (2,26 g, 6,69 mmoles) en 15 ml de isopropanol a temperatura ambiente. Precipita fácilmente un sólido blanco abundante. Se agita la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 2 días y se filtra. Se lava el sólido obtenido con isopropanol y se seca a vacío (10 mm de Hg) a 45 °C durante 10 horas, a 55 °C durante 6 horas y a 70 °C durante 17 horas para dar la sal de maleato como un sólido blanco (2,82 g, 96 %; contiene un 1,1 % de isopropanol tal como se deduce a partir de la RMN de <sup>1</sup>H).*

30 La sal de maleato puede caracterizarse fácilmente mediante el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (figura 9) que cambia de la misma manera que se ha descrito en profundidad para la sal de fumarato. Además, la señal del maleato aparece en el desplazamiento químico esperado de 6,30 ppm. Las integraciones de señales correspondientes al anión y al catión confirman inequívocamente que se forma la sal equimolecular, y no la disal.

En análisis de CDB (figura 10), con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, muestra un pico endotérmico intenso con un comienzo a 139 °C (101 J/g) correspondiente al punto de fusión. Se observa una pérdida de peso del 1 % en la TGA (figura 11) aproximadamente a la temperatura de fusión, probablemente debido a la pérdida de isopropanol residual. Se observa una clara descomposición de la sal a temperaturas por encima de 150 °C.

35 La caracterización de la sal de maleato es la siguiente (figuras 9-12):

*RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, d-cloroformo) δ: 2,35 (s, 3H), 3,02-3,64 (m, 6H), 3,99 (t, J = 5 Hz, 4H), 4,61-4,66 (m, 2H), 5,70 (s, 1H), 6,30 (s, 2H), 7,50-7,58 (m, 3H), 7,79-7,82 (m, 1H), 7,84-7,95 (m, 3H).*

*Disolventes residuales de RMN de <sup>1</sup>H: el 1,1 % p/p de isopropanol.*

40 *FTIR (ATR) υ: 3043, 2853, 1707, 1619, 1599, 1557, 1487, 1445 1374, 1357, 1340, 1302, 1237, 1163, 1135, 1096, 1041, 1022, 930, 919, 861, 817, 762 y 750 cm<sup>-1</sup>.*

*CDB (10 °C/min): Pico de fusión endotérmico con un comienzo a 139 °C.*

TGA (10 °C/min): Una pérdida de peso del 1,0 % entre 110-150 °C. El proceso de descomposición comienza a 150 °C.

#### Ejemplo 4: (referencia) preparación de la sal de metanosulfonato del compuesto 63

5 Durante la selección inicial con el primer conjunto de diez disolventes, no pudo cristalizarse la sal de metanosulfonato. La sal era muy soluble en todos los disolventes sometidos a ensayo (>200 mg/ml), produciendo aceites tras la evaporación completa del disolvente. Cuando se intentó la cristalización en el segundo conjunto de nueve disolventes más apolares, se recuperaron también aceites en la gran mayoría de los experimentos, o bien tras la evaporación del disolvente, o bien debido a que la sal oleosa no se disolvía. No obstante, se obtuvo un sólido cristalino correspondiente a la sal a partir de la disolución en tolueno enfriada hasta -18 °C tras separar el exceso de sal como un aceite. Por tanto, se eligió el tolueno para la optimización y aumento a escala de la síntesis de la sal.

10 En el primer intento de aumento a escala, se añadió ácido metanosulfónico directamente a una disolución en tolueno del compuesto 63, pero la sal se separó rápidamente como un aceite. Este aceite cristalizó tras agitarse junto con el disolvente durante varias horas a temperatura ambiente. Con el fin de provocar la cristalización directa de la sal sólida, se repitió el mismo procedimiento en presencia de cristales semente de la sal. Además, con el fin de mejorar el color de la sal, se destiló el ácido metanosulfónico justo antes de su uso (180 °C, 1 hPa).

15 El procedimiento experimental usado para preparar la sal de metanosulfonato a una escala de 2,5 g fue el siguiente:

20 *Se añade lentamente ácido metanosulfónico (0,45 ml, 6,94 mmoles) a una disolución de compuesto 63 (2,36 g, 6,98 mmoles) en 25 ml de tolueno a temperatura ambiente en presencia de semillas. Precipita fácilmente un sólido blanco abundante. Se agita la suspensión resultante a 0 °C durante 8 horas y se filtra. Se lava el sólido obtenido con tolueno y se seca a vacío (10 mm de Hg) a 45 °C durante 2 días y a 55 °C durante 6 horas para dar la sal de metanosulfonato como un sólido blanco (2,85 g, 98 %; contiene un 0,6 % de tolueno tal como se deduce a partir de la RMN de <sup>1</sup>H).*

25 La sal de metanosulfonato puede caracterizarse fácilmente mediante el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (figura 13) que cambia de la misma manera que se ha descrito en profundidad para la sal de fumarato. Además, la señal del metanosulfonato aparece a un desplazamiento químico de 2,84 ppm.

El análisis de CDB (figura 14), con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, muestra un pico endotérmico intenso con un comienzo a 145 °C (84 J/g) correspondiente al punto de fusión. Se observa una pérdida de peso del 0,5 % en la TGA (figura 15) aproximadamente a la temperatura de fusión, probablemente debido a la pérdida de tolueno residual. Se observa una clara descomposición de la sal a temperaturas por encima de 250 °C.

30 La caracterización de la sal de metanosulfonato es la siguiente (figuras 13-16):

*RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, d-cloroformo) δ: 2,36 (s, 3H), 2,84 (s, 3H), 3,03-3,15 (m, 2H), 3,54-3,61 (m, 2H), 3,63-3,71 (m, 2H), 3,97-4,05 (m, 2H), 4,10-4,20 (m, 2H), 4,71-4,76 (m, 2H), 5,75 (s, 1H), 7,50-7,59 (m, 3H), 7,79-7,82 (m, 1H), 7,84-7,95 (m, 3H).*

*Disolventes residuales de RMN de <sup>1</sup>H: el 0,58 % p/p de tolueno.*

35 *FTIR (ATR) ν: 3018, 2957, 2920, 2865, 2693, 2627, 1634, 1602, 1562, 1509, 1485, 1435, 1392, 1376, 1265, 1221, 1164, 1131, 1098, 1049, 1033, 1007, 934, 914, 862, 822, 772 y 759 cm<sup>-1</sup>.*

*CDB (10 °C/min): Pico de fusión endotérmico con un comienzo a 145 °C.*

*TGA (10 °C/min): Una pérdida de peso del 0,5 % entre 120 y 160 °C. El proceso de descomposición comienza a 260 °C.*

#### 40 Ejemplo 5: (referencia) preparación de la sal de etanosulfonato del compuesto 63

50 Durante la selección inicial con el primer conjunto de diez disolventes, solo pudo cristalizarse la sal de etanosulfonato en acetonitrilo. Pero, puesto que la sal era muy soluble en todos los disolventes sometidos a ensayo (>200 mg/ml), se obtuvo este sólido solo tras una evaporación completa del disolvente. En los experimentos restantes, se generó aceite tras la evaporación completa del disolvente. Cuando se intentó la cristalización en el segundo conjunto de nueve disolventes más apolares, se obtuvieron tres sólidos en metil-terc-butil-éter, acetato de isobutilo y tolueno mezclados con sal oleosa. En estos experimentos, la sal oleosa no se disolvió completamente. Se eligió el tolueno para optimizar y aumentar a escala la síntesis de la sal

En el aumento a escala inicial del etanosulfonato, se suspendió la sal oleosa en tolueno caliente y se dejó enfriar. La sal no cristalizó y permaneció como un aceite. En un segundo intento, en el que se añadió lentamente el ácido etanosulfónico a una disolución de compuesto 63 en tolueno, se separó un sólido marrón al enfriar. Cuando se repitió este mismo procedimiento a temperatura ambiente, apareció fácilmente aceite que cristalizó lentamente tras agitarse junto con el disolvente durante varios días. Con el fin de provocar la cristalización directa de la sal, se repitió

el mismo procedimiento a temperatura ambiente en presencia de cristales simiente de la sal. Además, con el fin de mejorar el color de la sal, se destiló el ácido etanosulfónico justo antes de su uso (200 °C, 1 hPa).

El procedimiento experimental usado para preparar la sal de etanosulfonato a una escala de 2,5 g fue el siguiente:

5 *Se añade lentamente ácido etanosulfónico (0,58 ml, 6,79 mmoles) a una disolución de compuesto 63 (2,29 g, 6,79 mmoles) en 40 ml de tolueno a temperatura ambiente en presencia de simientes. Precipita fácilmente un sólido blanco abundante. Se agita la suspensión resultante a 0 °C durante 12 horas y se filtra. Se lava el sólido obtenido con tolueno y se seca a vacío (10 mm de Hg) a 45 °C durante 8 horas y a 55 °C durante 6 horas para dar la sal de etanosulfonato como un sólido blanco (2,90 g, 99 %).*

10 La formación de la sal de etanosulfonato puede deducirse fácilmente a partir del espectro de RMN de <sup>1</sup>H (figura 17) que cambia, en comparación con el compuesto de partida 63, de la misma manera que se ha descrito en profundidad para la sal de fumarato. Además, aparecen señales del etanosulfonato a un desplazamiento químico de 1,37 y 2,93 ppm.

15 El análisis de CDB (figura 18), con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, muestra un pico endotérmico intenso con un comienzo a 133 °C (85 J/g) correspondiente al punto de fusión. Se observa una pérdida de peso del 0,3 % en la TGA (figura 19) aproximadamente a la temperatura de fusión, probablemente debido a la pérdida de tolueno residual. Se observa una clara descomposición de la sal a temperaturas por encima de 280 °C.

La caracterización de la sal de etanosulfonato es la siguiente (figuras 17-20):

20 *RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, d-cloroformo) δ: 1,37 (t, J = 7 Hz, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,93 (c, J = 7 Hz, 2H), 3,03-3,15 (m, 2H), 3,55-3,62 (m, 2H), 3,64-3,72 (m, 2H), 3,96-4,04 (m, 2H), 4,11-4,21 (m, 2H), 4,71-4,77 (m, 2H), 5,75 (s, 1H), 7,50-7,59 (m, 3H), 7,79-7,83 (m, 1H), 7,84-7,95 (m, 3H).*

*Disolventes residuales de RMN de <sup>1</sup>H: el 0,35 % p/p de tolueno.*

*FTIR (ATR) υ: 3021, 2958, 2924, 2863, 2625, 2488, 1633, 1603, 1565, 1508, 1485, 1470, 1437, 1391, 1376, 1353, 1334, 1265, 1242, 1210, 1160, 1149, 1131, 1098, 1027, 1008, 978, 934, 916, 856, 819, 776, y 739 cm<sup>-1</sup>.*

*CDB (10 °C/min): Pico de fusión endotérmico con un comienzo a 133 °C.*

25 *TGA (10 °C/min): Una pérdida de peso del 0,3 % entre 110 y 160 °C. El proceso de descomposición comienza a 280 °C.*

### **Ejemplo 6: (referencia) preparación de la sal de malato del compuesto 63**

30 Durante la selección inicial con el primer conjunto de diez disolventes, pudo cristalizarse la sal de malato en acetonitrilo e isopropanol. No obstante, la sal era muy soluble en ambos disolventes (>200 mg/ml) y se obtuvieron los dos sólidos solo tras una evaporación completa. En los experimentos restantes, se generó aceite tras la evaporación completa del disolvente. Cuando se intentó la cristalización en el segundo conjunto de nueve disolventes más apolares, aunque la sal era menos soluble, se obtuvo un sólido cristalino solo en 3-pentanona. Los otros experimentos produjeron aceite. Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió la 3-pentanona para optimizar y aumentar a escala la síntesis de la sal.

35 Se realizaron los intentos de aumento a escala iniciales para la preparación de la sal añadiendo una disolución de ácido L-málico en 3-pentanona a una disolución de compuesto 63 también en 3-pentanona a temperaturas entre 50 y 70 °C. Usando este procedimiento, la sal se separa algunas veces como un aceite al enfriar. Este aceite cristaliza fácilmente tras agitarse junto con el disolvente a 50 °C durante algunas horas. Pudo inducirse la producción directa de la sal cristalina mediante siembra, tal como se describe en el procedimiento usado para preparar la sal de malato a una escala de 2,5 g que sigue:

40 *Se añade lentamente una disolución de ácido L-málico (933 mg, 6,95 mmoles) en 10 ml de 3-pentanona a una disolución de compuesto 63 (2,35 g, 6,95 mmoles) en 10 ml de 3-pentanona a 50 °C con cristales simiente. Precipita fácilmente un sólido blanco abundante, y se diluye la suspensión resultante con otros 10 ml de 3-pentanona, se enfría lentamente hasta temperatura ambiente, se agita durante 12 horas y se filtra. Se lava el sólido obtenido con 3-pentanona y se seca a vacío (10 mm de Hg) a 45 °C durante 15 horas y a 55 °C durante 6 horas para dar la sal de malato como un sólido blanco (3,03 g, 95 %).*

45 La formación de la sal de malato puede deducirse fácilmente a partir del espectro de RMN de <sup>1</sup>H (figura 21) que cambia significativamente, en comparación con el compuesto de partida 63, de la misma manera que se ha descrito en profundidad para la sal de fumarato. Además, aparecen señales del malato a un desplazamiento químico de 2,59, 2,79 y 4,31 ppm.

50 En el análisis de CDB (figura 22), con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, se observa un pico endotérmico intenso con un comienzo a 125 °C (119 J/g) correspondiente a la temperatura de fusión. Además, el análisis de TGA (figura 23) no muestra ninguna pérdida de peso a temperaturas por debajo del punto de fusión, lo que indica la

ausencia de compuestos volátiles. Puede confirmarse también la ausencia de disolventes residuales a partir del espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

La caracterización de la sal de malato es la siguiente (figuras 21-24):

5 *RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, *d*4-metanol)  $\delta$ : 2,35 (s, 3H), 2,59 (dd,  $J^1 = 16$  Hz,  $J^2 = 7$  Hz, 1H), 2,79 (dd,  $J^1 = 16$  Hz,  $J^3 = 5$  Hz, 1H), 2,89-2,97 (m, 4H), 3,13 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 3,80 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 4,39 (dd,  $J^2 = 7$  Hz,  $J^3 = 5$  Hz, 1H), 4,43 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 5,83 (s, 1H), 7,52-7,61 (m, 3H), 7,89-7,96 (m, 3H), 8,00 (d,  $J = 9$  Hz, 1H).*

*FTIR (ATR)  $\nu$ : 3171, 3003, 2874, 1718, 1597, 1556, 1487, 1468, 1440, 1360, 1268, 1142, 1126, 1097, 1050, 1022, 1010, 986, 950, 920, 902, 863, 822, 797, 770, 746 y 742  $\text{cm}^{-1}$ .*

*CDB (10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ):* Pico de fusión endotérmico con un comienzo a 125  $^\circ\text{C}$ .

10 *TGA (10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ):* Una pérdida de peso que comienza a 150  $^\circ\text{C}$  debido a descomposición.

### **Ejemplo 7: (referencia) preparación de la sal de malonato del compuesto 63**

15 Durante la selección inicial con el primer conjunto de diez disolventes, solo pudo cristalizarse la sal de malonato en isopropanol. No obstante, la sal era muy soluble en este disolvente (>200 mg/ml), lo que anticipaba problemas de aumento a escala. Por este motivo, se intentó la cristalización en el segundo conjunto de nueve disolventes más apolares. En este segundo conjunto de experimentos, se obtuvo un sólido cristalino solo a partir de metil-terc-butil-éter al enfriar una disolución saturada hasta -18  $^\circ\text{C}$  tras separar, a alta temperatura, una parte abundante de la sal como un aceite.

20 Teniendo en cuenta estos resultados, se intentó en primer lugar el aumento a escala de la sal de malonato en isopropanol. De manera muy decepcionante, el aceite se separó justo tras mezclar el ácido y el compuesto 63. El aceite cristalizó en un escaso rendimiento tras agitarse durante varias horas junto con el disolvente. Pudo mejorarse el rendimiento cuando se añadió metil-terc-butil-éter durante el proceso de cristalización tras la formación de aceite. Para evitar la generación de la sal inicialmente como un aceite y mejorar el rendimiento, se modificó el proceso de cristalización. Se añadió una disolución de ácido malónico en isopropanol a una disolución de compuesto 63 en metil-terc-butil-éter. Usando este procedimiento, se generó directamente la sal como un sólido pero todavía podía observarse algo de formación de aceite. Finalmente, pudo obtenerse la cristalización completa y directa de la sal con siembra tal como se describe en el siguiente procedimiento:

25 *Se añade lentamente una disolución de ácido malónico (736 mg, 7,07 mmoles) en 10 ml de isopropanol a una disolución de compuesto 63 (2,38 g, 7,06 mmoles) en 15 ml de metil-terc-butil-éter sembrado a 0  $^\circ\text{C}$ . Precipita fácilmente un sólido blanco abundante. Se agita la suspensión resultante en primer lugar a temperatura ambiente durante 12 horas, luego a 0  $^\circ\text{C}$  durante 2 horas y se filtra. Se lava el sólido obtenido con metil-terc-butil-éter y se seca a vacío (10 mm de Hg) a 45  $^\circ\text{C}$  durante 7 horas y a 55  $^\circ\text{C}$  durante 6 horas para dar la sal de malonato como un sólido blanco (2,42 g, 80 %).*

35 La formación de la sal de malonato puede deducirse fácilmente a partir del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 25) que cambia, en comparación con el compuesto de partida 63, de la misma manera que se ha descrito en profundidad para la sal de fumarato. Además, aparecen señales del malonato a un desplazamiento químico de 3,23 ppm.

40 El análisis de CDB (figura 26), con una velocidad de calentamiento de 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ , muestra un pico endotérmico intenso con un comienzo a 90  $^\circ\text{C}$  (85 J/g) correspondiente al punto de fusión. No se observan pérdidas de peso en la TGA (figura 27) a temperaturas por debajo de la temperatura de fusión. No obstante, pudieron detectarse disolventes residuales (el 0,2 % p/p de isopropanol y el 0,2 % de metil-terc-butil-éter) a partir de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

La caracterización de la sal de malonato es la siguiente (figuras 25-28):

*RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, *d*-cloroformo)  $\delta$ : 2,35 (s, 3H), 3,10-3,40 (m, 4H), 3,23 (s, 2H), 3,40-3,46 (m, 2H), 3,97 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 4,59-4,64 (m, 2H), 5,70 (s, 1H), 7,49-7,58 (m, 3H), 7,79-7,82 (m, 1H), 7,84-7,95 (m, 3H).*

*Disolventes residuales de RMN de  $^1\text{H}$ :* el 0,2 % p/p de isopropanol y el 0,2 % de metil-terc-butil-éter.

45 *FTIR (ATR)  $\nu$ : 3148, 3027, 2942, 2857, 1718, 1621, 1599, 1561, 1488, 1443, 1374, 1343, 1308, 1260, 1165, 1135, 1097, 1080, 1046, 1022, 1011, 932, 918, 863, 819 y 752  $\text{cm}^{-1}$ .*

*CDB (10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ):* Pico de fusión endotérmico con un comienzo a 90  $^\circ\text{C}$ .

*TGA (10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ):* Pérdida de peso que comienza a 100  $^\circ\text{C}$  debido a descomposición.

### **Resumen de la selección de la cristalización de la sal**

Los intentos de formar sales del compuesto 63 con ácido sulfúrico y ácido L-tartárico fueron insatisfactorios y solo se obtuvieron aceites.

5 Solo se obtuvieron otras sales, aunque en forma sólida, mediante un procedimiento sintético complejo en comparación con la parte experimental de la síntesis de clorhidrato, o en condiciones experimentales únicas. Además, se obtuvo frecuentemente un sólido no cristalino en lugar de la forma cristalina obtenida para el clorhidrato. Todas estas desventajas implican que el aumento a escala para el procedimiento sintético asociado será muy complicado.

En la siguiente tabla 8 se muestra un resumen de datos clave referidos a cada sal sólida preparada a gran escala en esta invención: grado de cristalinidad, disolvente de cristalización, rendimiento y temperatura de fusión.

10

Tabla 8

Sal	Cristalinidad	Disolvente / rendimiento	Temperatura de fusión
<b>Clorhidrato</b>	Cristalina	Isopropanol/63 %*	194 °C
<b>Fumarato</b>	Cristalina	Etanol / acetonitrilo 59 %	131 °C
<b>Maleato</b>	Cristalina	isopropanol / 96 %	139 °C
<b>Metanosulfonato</b>	Cristalina	tolueno / 98 %	145 °C
<b>Etanosulfonato</b>	Cristalina	tolueno / 99 %	133 °C
<b>Malato</b>	Cristalina	3-pentanona / 95 %	125 °C
<b>Malonato</b>	Cristalina	isopropanol / metil <i>terc</i> -butil éter 80 %	90 °C

(\*) Se hicieron dos cristalizaciones (véase el ejemplo 1)

15 Tal como puede observarse a partir de lo anterior, se obtiene siempre la sal de clorhidrato como un sólido cristalino con un rendimiento muy bueno (incluyendo cristalización) y tiene un punto de fusión superior en 50 °C a las otras sales, lo que implica claramente una ventaja en relación con la estabilidad física. Adicionalmente, al comparar el análisis de TGA, el clorhidrato tiene un perfil limpio y no se detectan pérdidas de disolvente.

Además, se realizaron algunos experimentos adicionales (solubilidad termodinámica, farmacocinética) para el ejemplo 1 (P027) con el fin de confirmar la idoneidad de este compuesto para fines farmacéuticos.

#### **Ejemplo 8 - Solubilidad termodinámica**

Se describe a continuación el protocolo general para determinar la solubilidad termodinámica a pH 7,4 y pH 2.

20 ○ A) Solubilidad termodinámica a pH 7,4

Tampón pH 7,4 (50 mM)

Se preparó el tampón fosfato a pH 7,4 tal como sigue:

- Se preparó una disolución 25 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (para 1 l de agua, peso de 8,96 g)
- Se preparó una disolución 25 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (durante 1 l de agua, peso de 3,4 g).
- 25 - Se mezclaron 812 ml de disolución de fosfato de disodio + 182 ml de disolución de fosfato de potasio y se comprobó que el pH era de 7,4.

#### **Equilibrio de muestras**

Se equilibraron las muestras usando:

- Una agitadora Thermomixer Control de Eppendorf a 25 °C y 1250 rpm
- 30 - Un medidor del pH con un electrodo combinado de pH semimicro

Procedimiento

Compuesto problema

Se pesaron 2 mg en un vial de HPLC (por duplicado) y se añadió 1 ml de tampón. Se mantuvo el vial a 25 °C, en la agitadora Thermomixer Comfort., durante 24 horas. Siguió una centrifugación a 4000 rpm durante 15 min.

- 5 Se recogió la capa superior resultante con una pipeta de vidrio y se transfirió a los viales de HPLC. Se centrifugó de nuevo y se programó el inyector a una altura de 2,7 mm.

Patrones (por duplicado)

Disol. A: 2 mg en 5 ml de metanol (400 ug/ml)

Disol. B: 1 ml de disol. A hasta 10 ml con metanol (40 ug/ml)

- 10 Disol. C: 5 ml de disol. B hasta 50 ml con metanol (4 ug/ml)

Disol. D: 4 ml de disol. C hasta 10 ml con metanol (1,6 ug/ml)

Disol. E: 5 ml de disol. D hasta 25 ml con metanol (0,32 ug/ml)

Se inyectaron 10 µl de todas las disoluciones preparadas, comenzando con el patrón más diluido. Se inyectaron también blancos, para comprobar la ausencia de contaminación.

- 15 Se preparó la curva de calibración patrón (véase la figura 29). Se considera  $Y = \text{área}$  y  $X = \mu\text{g}$  de patrón inyectados.

Se inyectaron 10 µl de disolución de compuesto problema, por duplicado y se interpoló el área de pico promedio (si era cuantificable) en la curva patrón (véanse las tablas 9, 10 y 11 y el ejemplo a continuación).

Condiciones cromatográficas

- Columna: XBridge C18 (o similar) 2,5 µm 4,6x 50 mm
- 20 - Temperatura: 35 °C
- Fase móvil: ACN / bicarbonato de amonio 10 mM.
- Gradiente: 0-3,5 min: de desde el 15 % de ACN hasta el 95 % de ACN  
3,5 – 5 min: el 95 % de ACN  
5 – 6 min: del 95 al 15 % de ACN  
25 6 – 8 min: el 15 % de ACN
- Flujo: 1,5 ml/min.
- Detección: aproximadamente la absorción UV máxima

o B) Solubilidad termodinámica a pH 2

Se ejecutó el procedimiento anterior con HCl 0,01 N.

- 30 Solubilidad termodinámica para el ejemplo 1

Según el protocolo descrito, se obtuvieron 227 µg/ml (pH=7,4). Véase el gráfico asociado en la figura 29.

Tabla 9

**CALIBRACIÓN**  
**Pico: Muestra**

Nombre de la muestra	Fecha de adquisic.	Vial	RT (min)	Vol. (ul)	Detección	Dil.	Valor de X	Área	Id. de res.	Id. de cal.	Peso de muestra	Altura (µV)
Ejemplo 1 Pat.(50ug/ml) 1	22/07/2010 17:09:51	3	16,1	5	PDA 260.0 nm	100.00	250.000	1235989	40781	40782	5000.000	225760
Ejemplo 1 Pat.(50ug/ml) 1	22/07/2010 17:40:38	3	16,1	5	PDA 260.0 nm	100.00	250.000	1237942	40785	40782	5000.000	226564
Ejemplo 1 Pat.(250ug/ml) 1	22/07/2010 18:11:31	4	16,1	5	PDA 260.0 nm	20.00	1250.000	6158085	40787	40782	5000.000	1132809
Ejemplo 1 Pat.(250ug/ml) 1	22/07/2010 18:42:21	4	16,1	5	PDA 260.0 nm	20.00	1250.000	6135000	40789	40782	5000.000	1129396
Ejemplo 1 Pat.(500ug/ml) 1	22/07/2010 19:13:10	5	16,1	5	PDA 260.0 nm	10.00	2500.000	11826040	40791	40782	5000.000	2158910
Ejemplo 1 Pat.(500ug/ml) 1	22/07/2010 19:44:00	5	16,1	5	PDA 260.0 nm	10.00	2500.000	11849583	40793	40782	5000.000	2168579

Tabla 10

**MUESTRAS**  
**muestra: pH 7,4**

	Muestra	muestra	Vial	RT	Fecha de adquisic.	Dilución	Vol. inj. (ul)	Detección	Área	Altura
1	Ejemplo1 PROB 1	pH7,4	13	16,1	23/07/2010 14:30:00	1.00	5	PDA 260.0 nm	5520635	1006234
2	Ejemplo1 PROB 1	pH7,4	13	16,1	23/07/2010 15:00:50	1.00	5	PDA 260.0 nm	5527190	1002480
3	Ejemplo1 PROB 2	pH7,4	14	16,1	23/07/2010 15:31:42	1.00	5	PDA 260.0 nm	5433650	992252
4	Ejemplo1 PROB 2	pH7,4	14	16,1	23/07/2010 16:02:29	1.00	5	PDA 260.0 nm	5438948	988427
Media										
% de DER										

5

Tabla 11

**MUESTRAS**  
**muestra: pH7.4**

	Conc.	Unid.	Id. de res.	Id. de cal.	Peso de la muestra
1	229,0	ug/ml	40794	40782	1,00
2	229,3	ug/ml	40795	40782	1,00
3	225,3	ug/ml	40796	40782	1,00
4	225,5	ug/ml	40797	40782	1,00
Media	227,262				
% de DER	0,9				

**Ejemplo 9 - Parámetros farmacocinéticos Cmax y AUC**

10 Se sometió a prueba la farmacocinética del ejemplo 1 en ratas Wistar Hannover tras una única administración oral de 25 mg/kg (expresado como compuesto 63). Para este fin, se recogieron muestras de plasma a diferentes puntos de tiempo y se analizaron usando un procedimiento de HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) con detección de fluorescencia.

Obtención de las muestras

15 Se usaron dos grupos en esta prueba. El grupo 1 recibió vehículo y el grupo 2 recibió el ejemplo 1 a 25 mg/kg con un volumen de administración de 10 ml/kg.

Se extrajeron muestras de sangre de la zona retroorbital a los siguientes puntos de tiempo: antes de la dosis, 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h y 24 h. Entonces se transfirió la sangre a tubos de plástico que contenían heparina. Se obtuvo plasma mediante centrifugación a aproximadamente 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se marcaron estas muestras de plasma y se congelaron a una temperatura de aproximadamente -65 °C hasta su análisis.

#### Análisis de las muestras

Se analizaron las muestras mediante un procedimiento analítico previamente validado. En resumen, se descongelaron muestras de plasma de rata a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a aproximadamente 4 °C. Se colocaron 300 µl de muestras de plasma en viales y se hicieron adiciones conocidas con 30 µl de disolución de trabajo patrón interna. Se taparon los viales y se mezclaron meticulosamente.

Se usó el siguiente procedimiento de extracción en fase sólida para la extracción del ejemplo 1.

1. Activación del cartucho con metanol durante 1 min a 1,5 ml/min.
2. Activación del cartucho con agua durante 2 min a 1,5 ml/min.
3. Carga de la muestra (80 µl) en el cartucho con agua durante 1,5 min a 1,0 ml/min.
4. Enjuague con agua/ACN (90/10, v/v) durante 30 s. a 1,5 ml/min.
5. Elución de la muestra con la fase móvil durante 1 min a 0,5 ml/min.
6. Lavado de los capilares y el cartucho con agua y metanol.

Después se sometieron a cromatografía las muestras usando como fase móvil una mezcla de fosfato de potasio monobásico 20 mM ajustado a pH 3 y acetonitrilo (70-73 %) A y (30 - 27 %) B (v/v) a temperatura ambiente. La velocidad de flujo usada fue de 0,5 ml/min y el tiempo de análisis fue de aproximadamente 17 min.

Se cuantificaron los picos correspondientes al ejemplo 1 y su patrón interno mediante detección de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 360 nm. El resto de los parámetros fueron: tiempo de respuesta: > 0,2 min (patrón 4s) y aumento de PMT de 8.

#### Parámetros farmacocinéticos

Se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos a partir de las curvas de nivel plasmático medio por medio de cinética no compartimental usando el programa informático WinNonlin Professional versión 5.0.1.

Se obtuvieron los valores de concentración plasmática pico ( $C_{max}$ ) y el tiempo hasta alcanzar tal concentración ( $t_{max}$ ) directamente de los datos experimentales. Se calculó la constante de eliminación ( $k_{el}$ ) mediante regresión lineal de la última fase de la curva (log. de la concentración frente al tiempo). Se determinó la semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) con la expresión  $t_{1/2} = 0,693/k_{el}$ . Se calculó el área bajo la curva de los niveles plasmáticos frente al tiempo desde cero hasta el último tiempo determinado ( $AUC_{0-t}$ ) por medio del procedimiento trapezoidal. Se calculó el área bajo la curva de los niveles plasmáticos frente al tiempo desde cero hasta infinito ( $AUC_{0-\infty}$ ) con la expresión:  $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{\text{últ.}}/k_{el}$ , en la que  $C_{\text{últ.}}$  es la concentración plasmática en el último tiempo medido.

#### Parámetros farmacocinéticos $C_{max}$ y AUC del ejemplo 1

Según el protocolo descrito se obtuvo  $C_{max}$ : 1152,8 ng/ml,  $AUC_{0-t}$ : 1218,4 ng.h/ml y  $AUC_{0-\infty}$ : 1249,6 ng.h/ml. Véanse los gráficos asociados en la figura 30.

Los resultados obtenidos en las dos últimas pruebas (solubilidad y farmacocinética) refuerzan al clorhidrato como la mejor sal para el compuesto 63 para estudios clínicos y formulaciones relacionadas.

**REIVINDICACIONES**

1. Sal de clorhidrato de 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina.
2. Procedimiento para la preparación de la sal de clorhidrato según reivindicación 1, que comprende:
  - 5 a) mezclar 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina y una disolución que contiene ácido clorhídrico, y
  - b) aislar la sal de clorhidrato resultante.
3. Composición farmacéutica que comprende la sal de clorhidrato según la reivindicación 1.
4. Sal de clorhidrato según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
- 10 5. Sal de clorhidrato según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección o una enfermedad mediada por receptores sigma.
- 15 6. Sal de clorhidrato según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diarrea; trastornos lipoproteicos; migraña; obesidad; artritis; hipertensión; arritmia; úlcera; déficits de aprendizaje, memoria y atención; trastornos de la cognición; enfermedades neurodegenerativas; enfermedades desmielinizantes; adicción a fármacos y sustancias químicas incluyendo cocaína, anfetamina, etanol y nicotina; discinesia tardía; accidente cerebrovascular isquémico; epilepsia; accidente cerebrovascular; estrés; cáncer; estados psicóticos, en particular depresión, ansiedad o esquizofrenia; inflamación; o enfermedades autoinmunitarias.

FIGURA 1

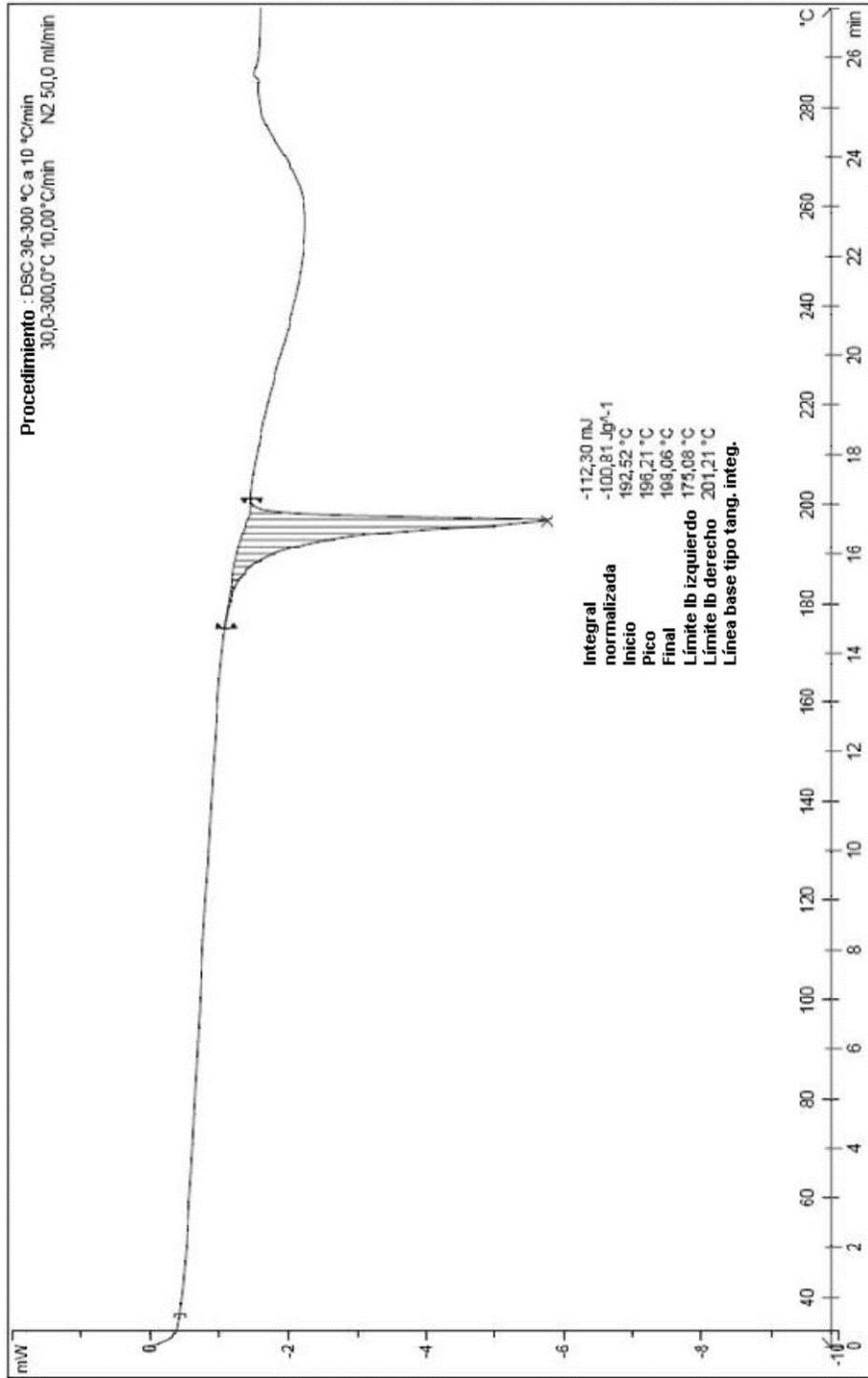
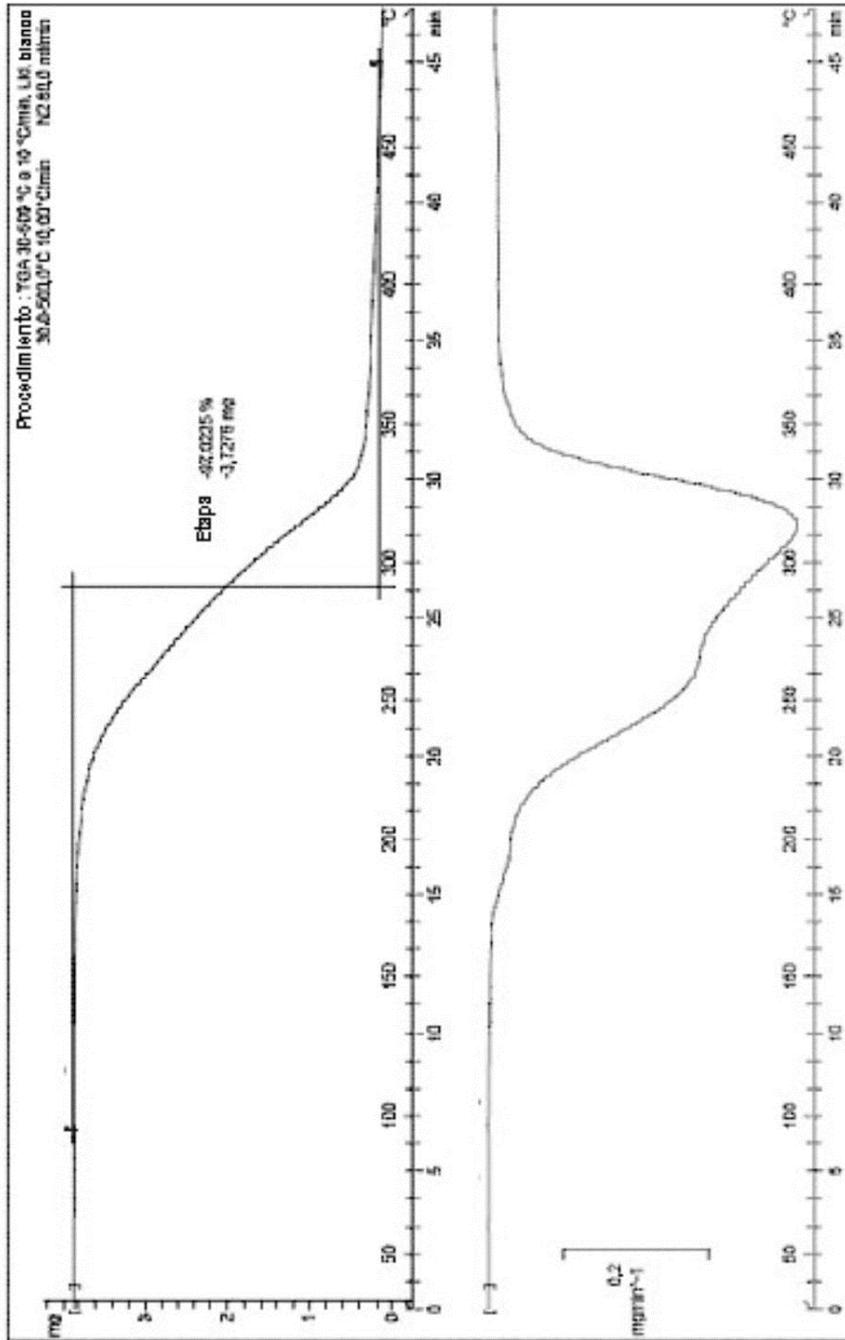
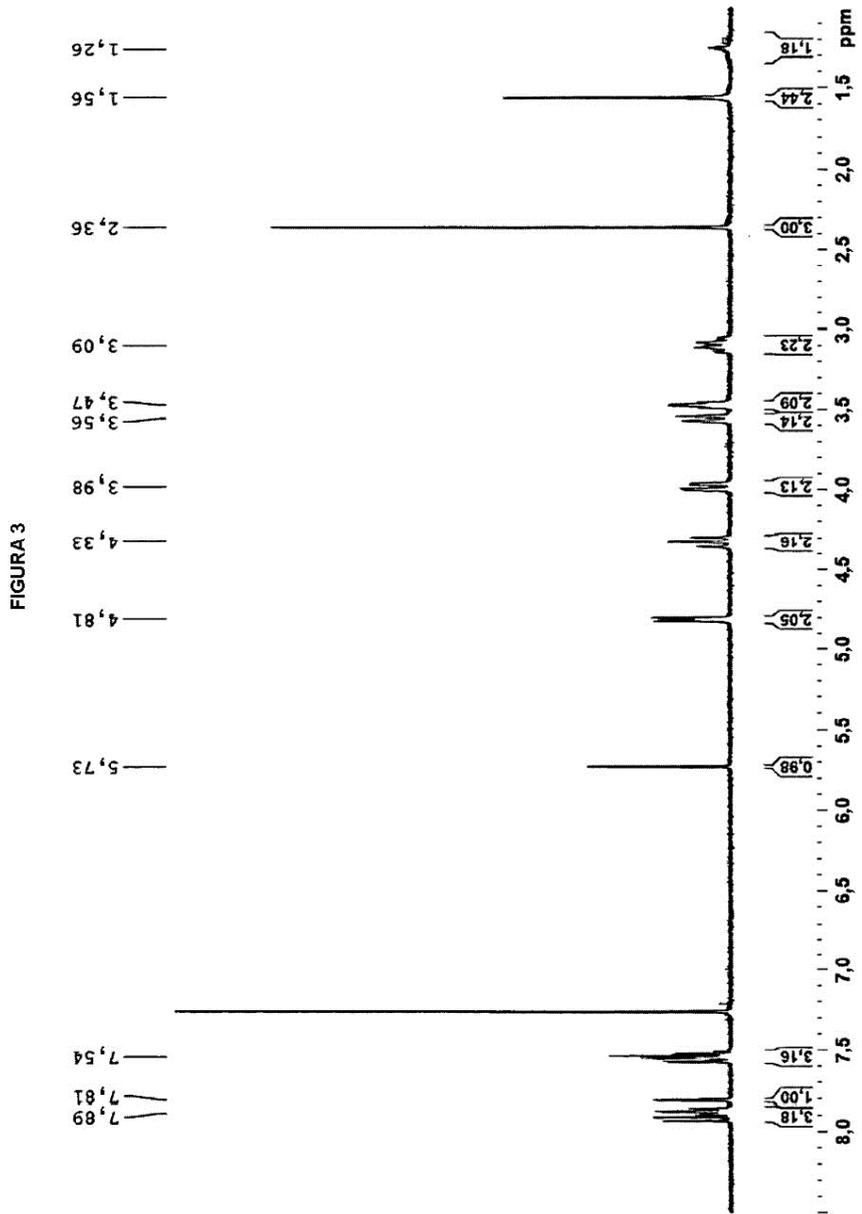
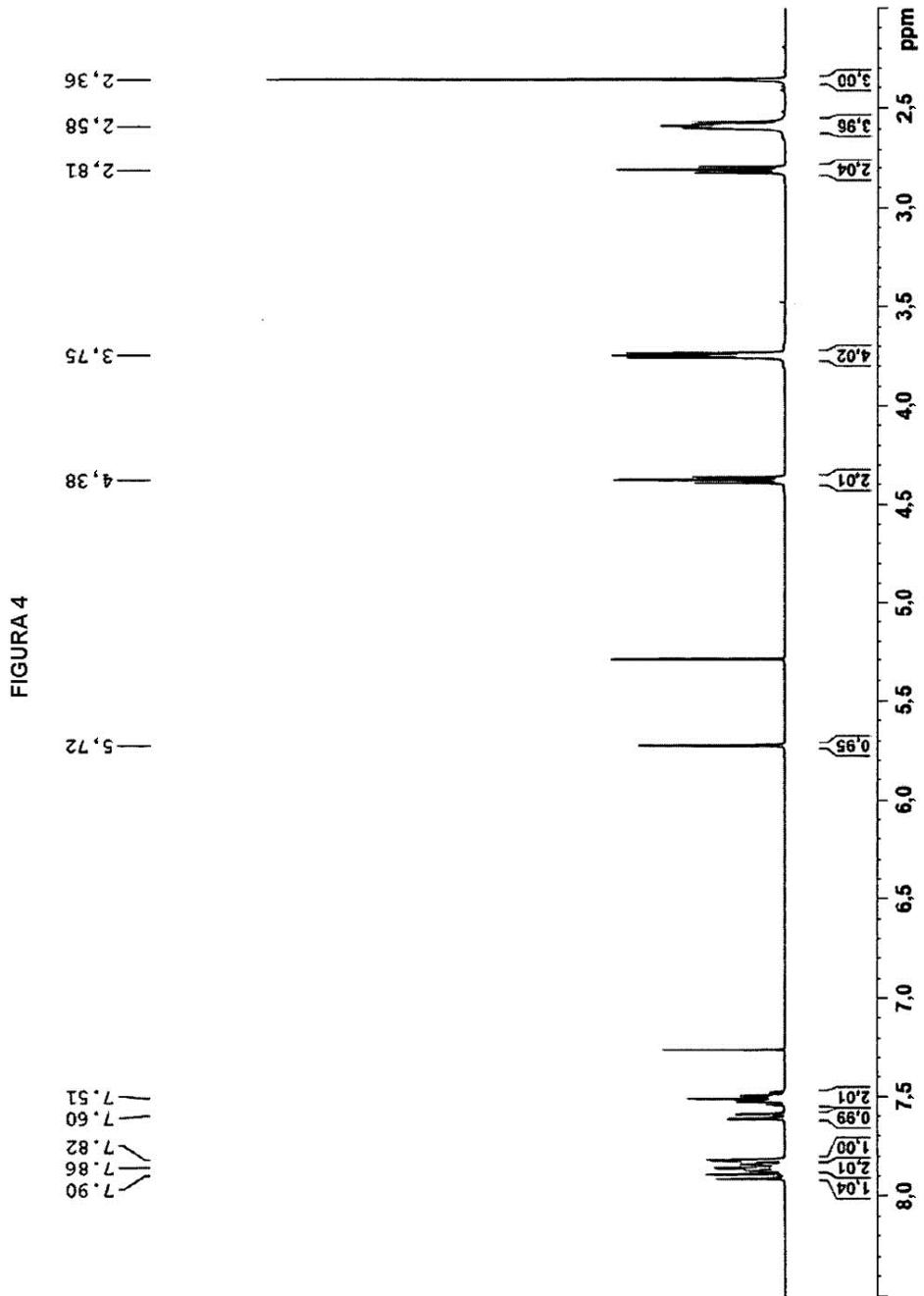


FIGURA 2







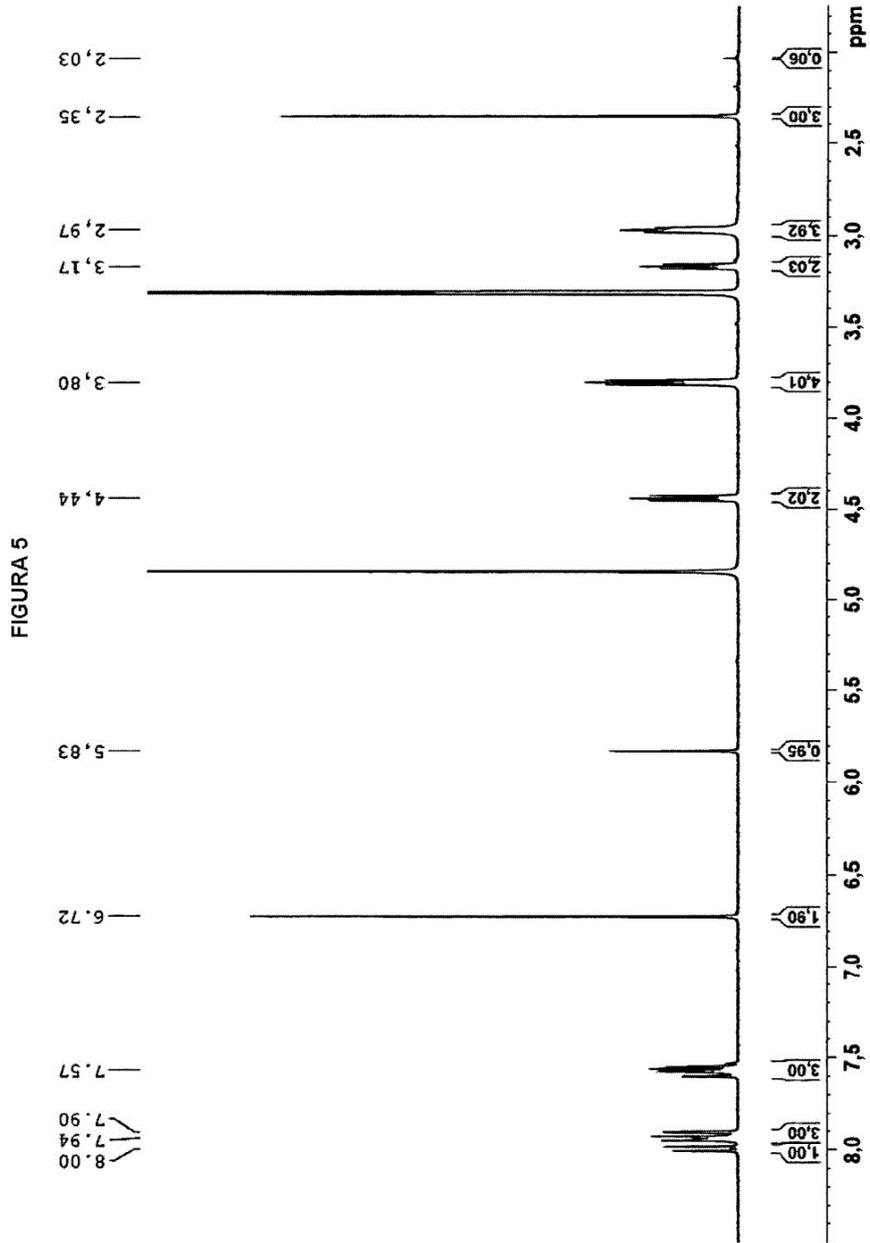


FIGURA 6

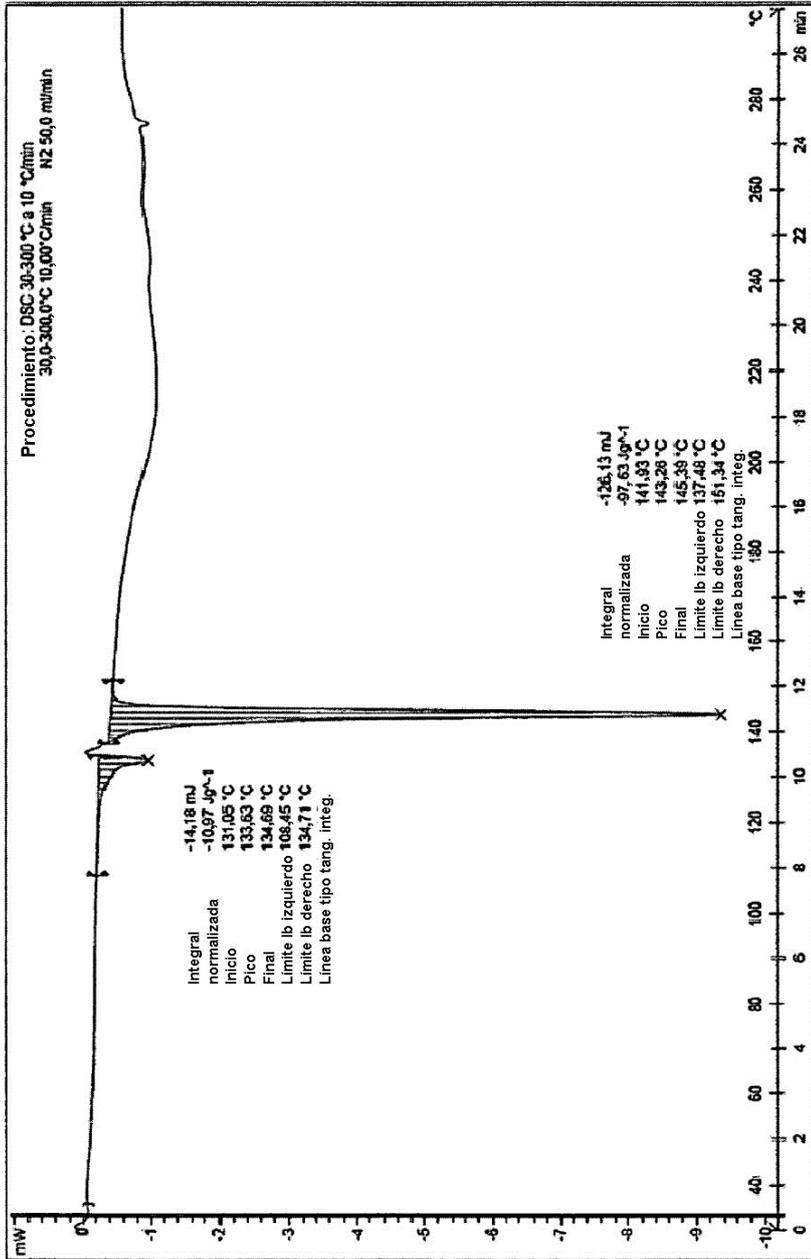
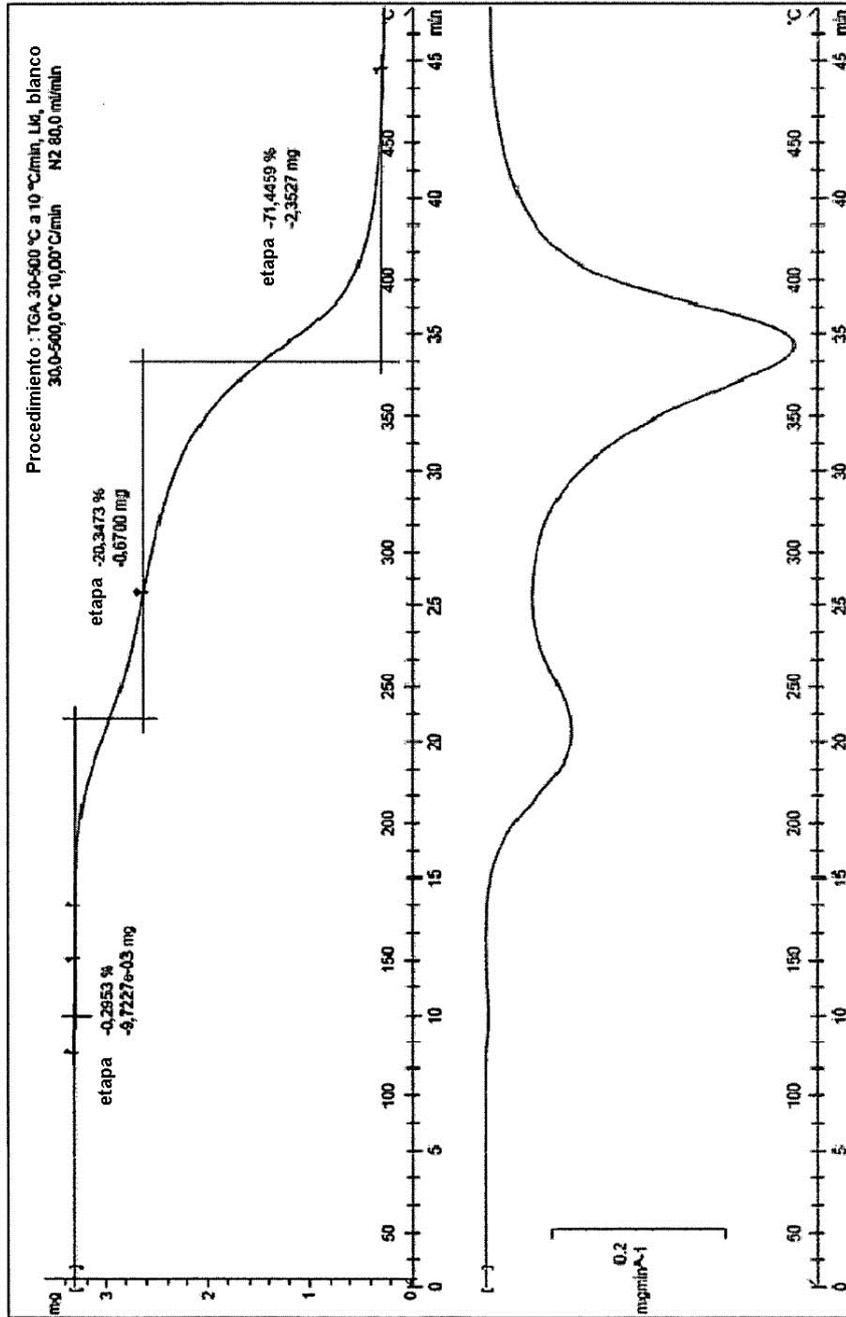
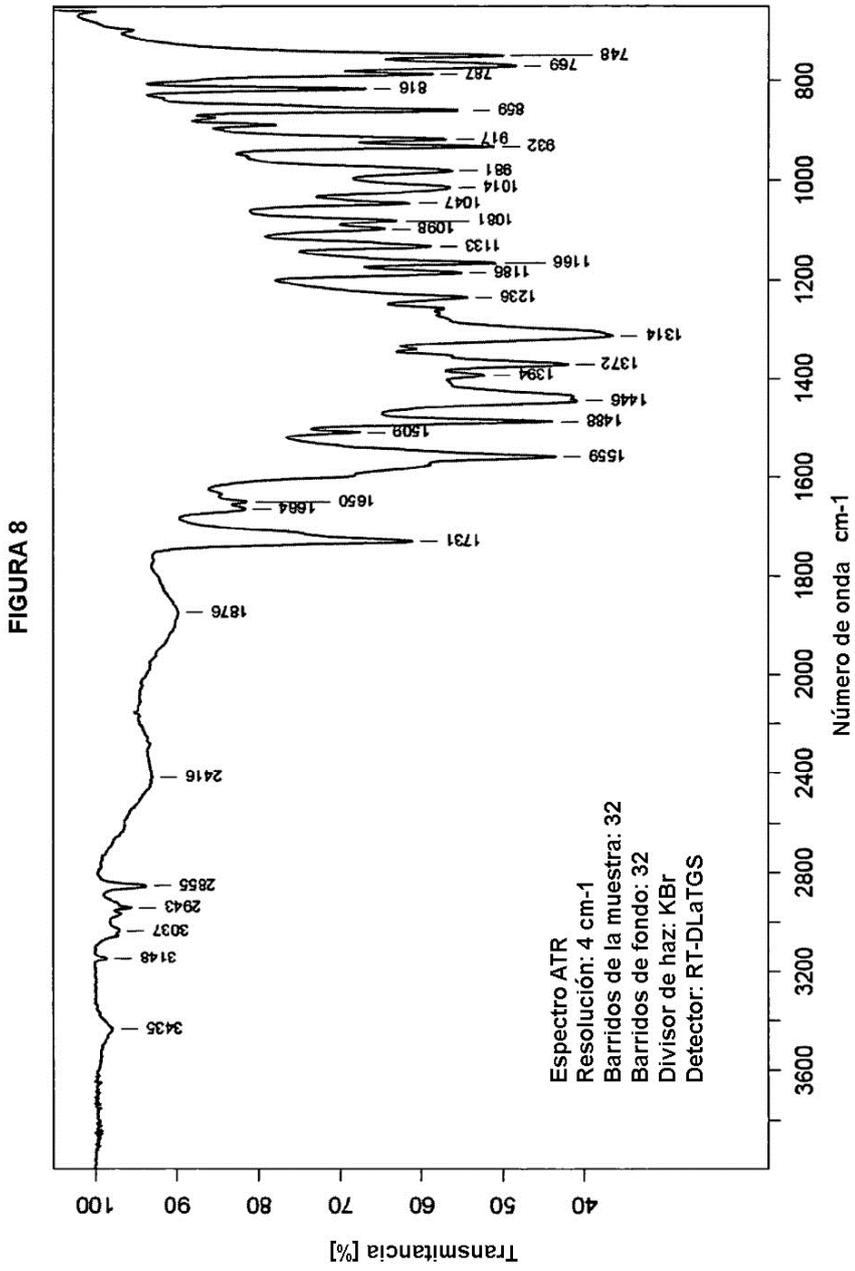


FIGURA 7





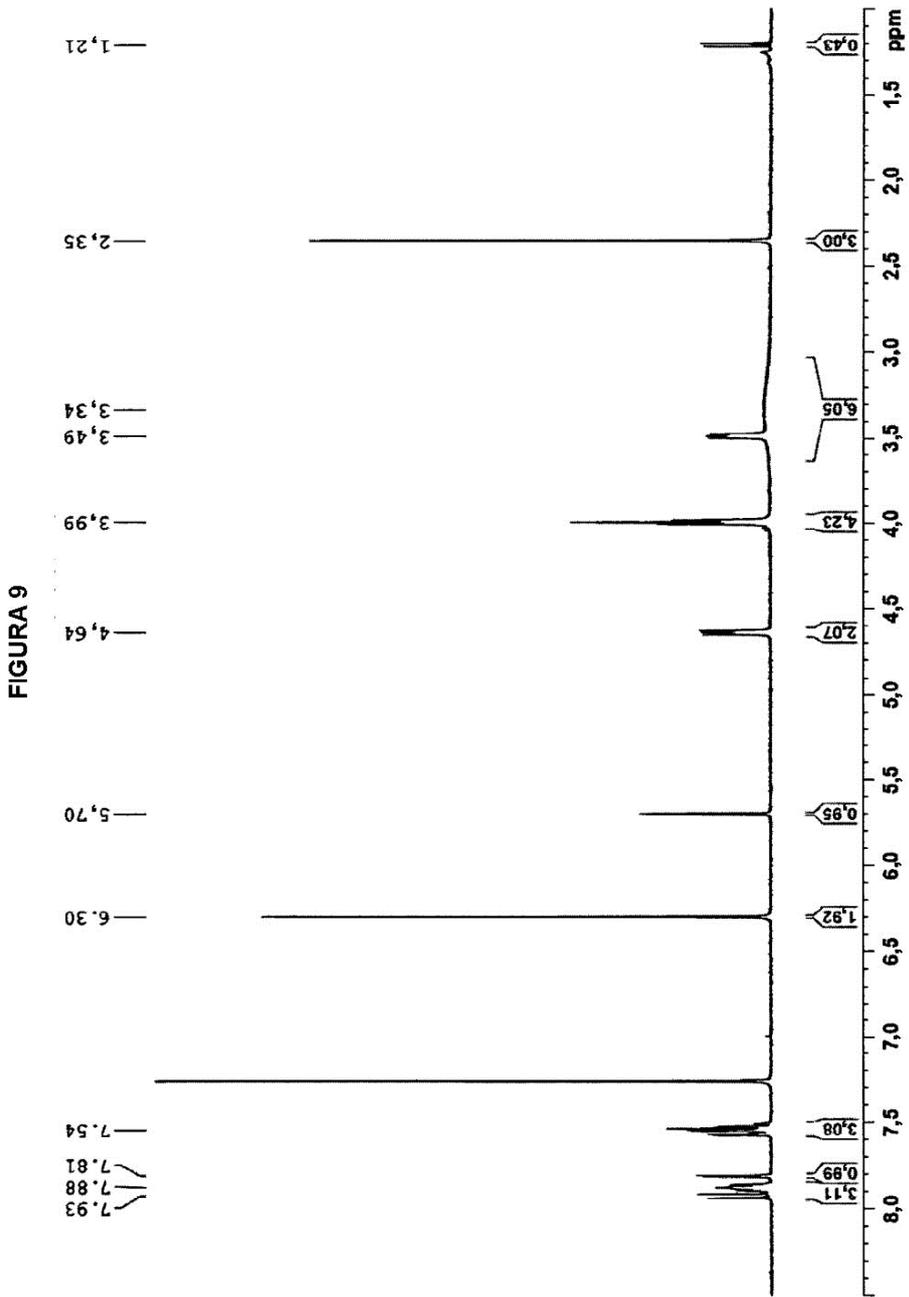


FIGURA 10

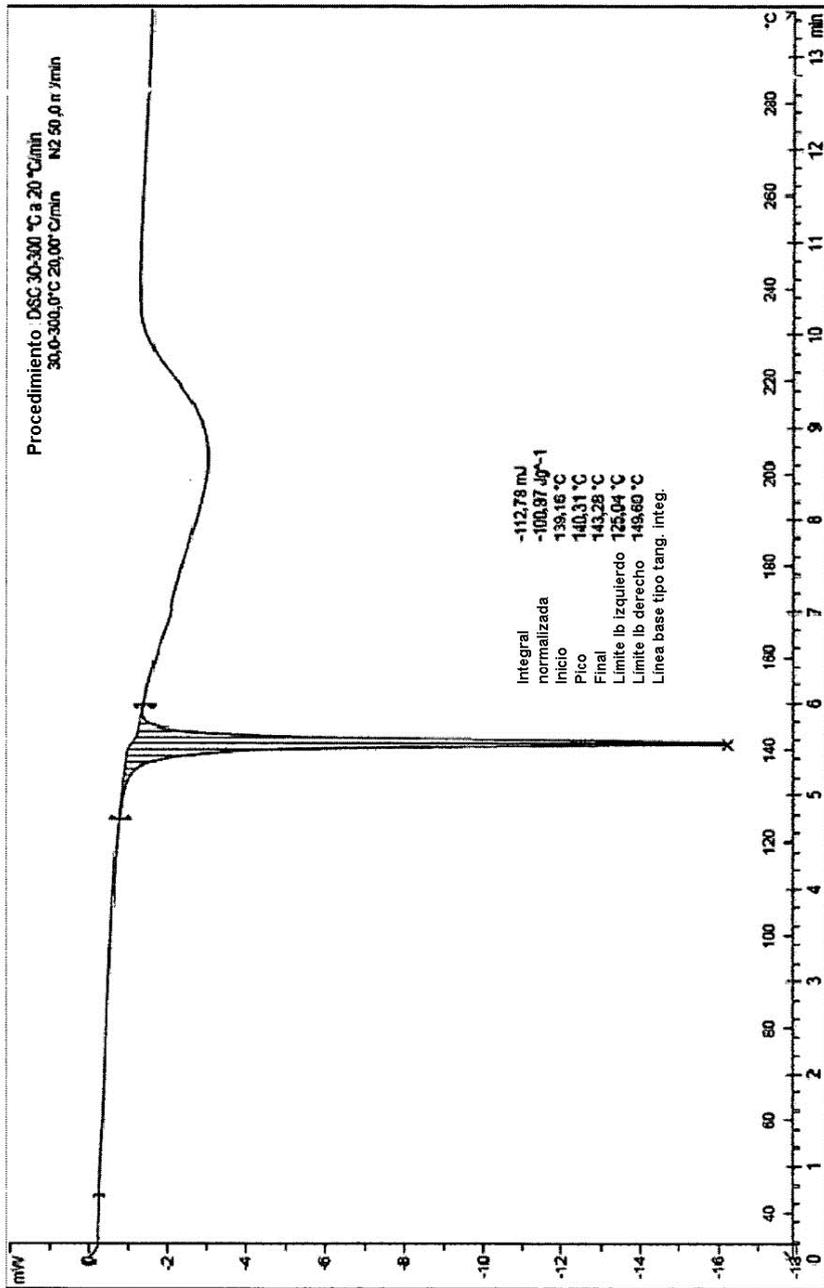
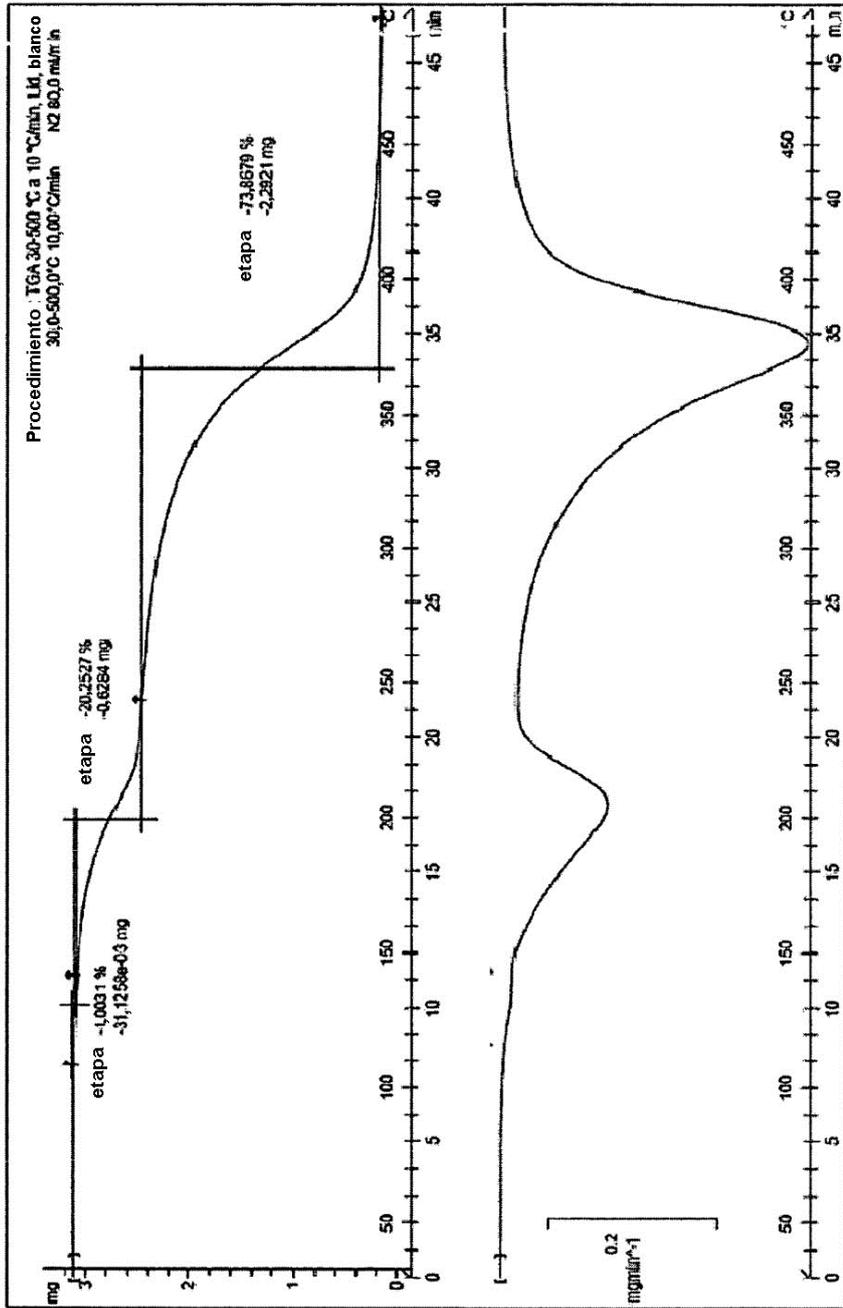
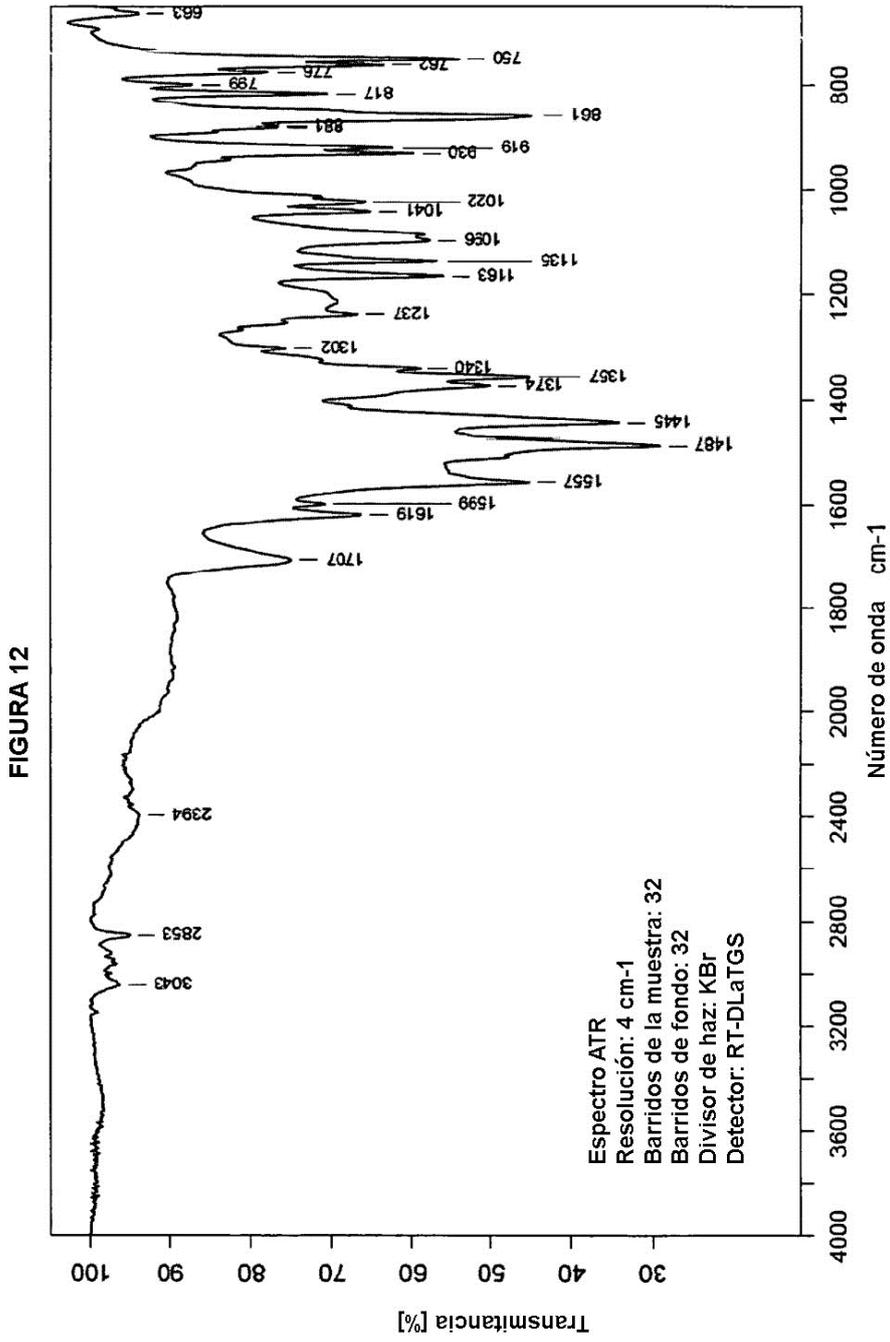


FIGURA 11





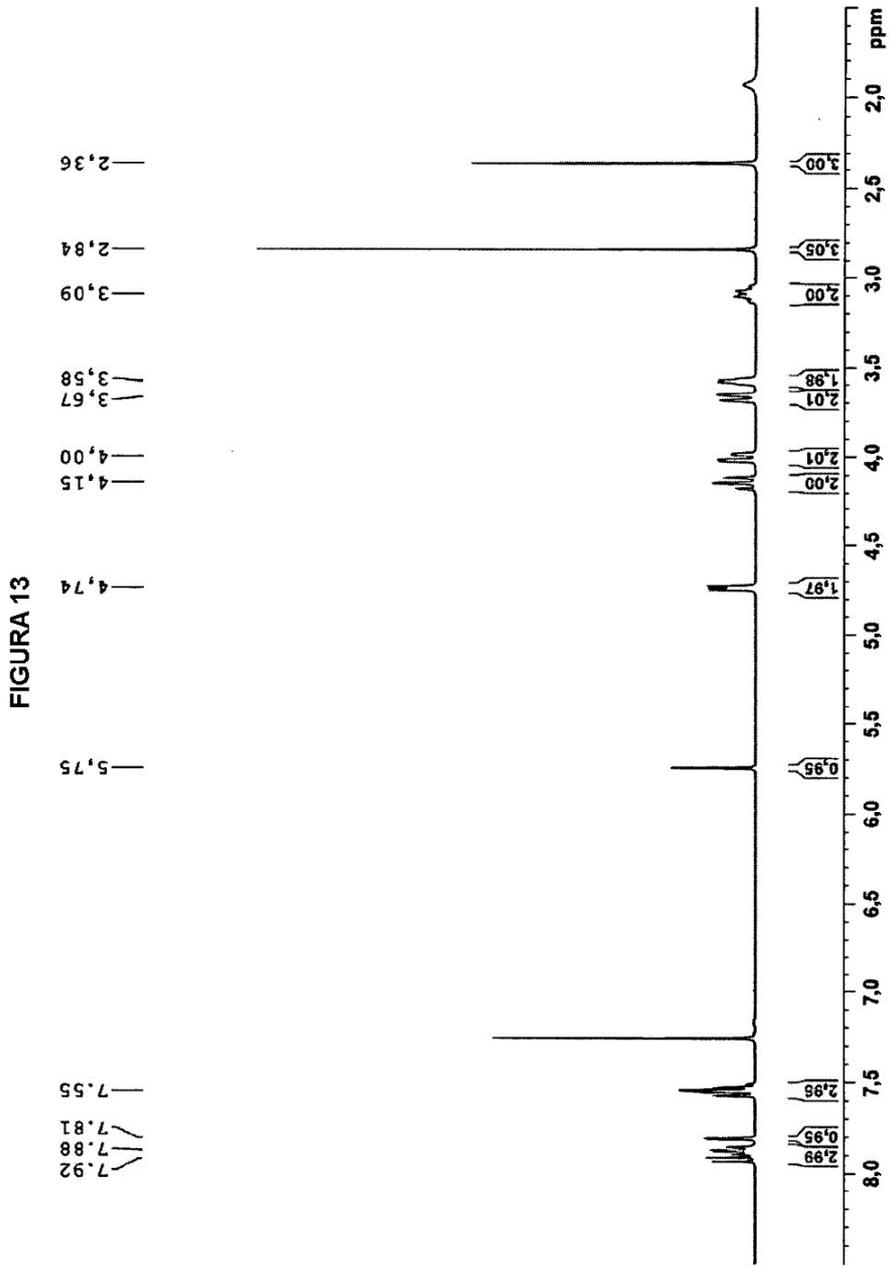


FIGURA 14

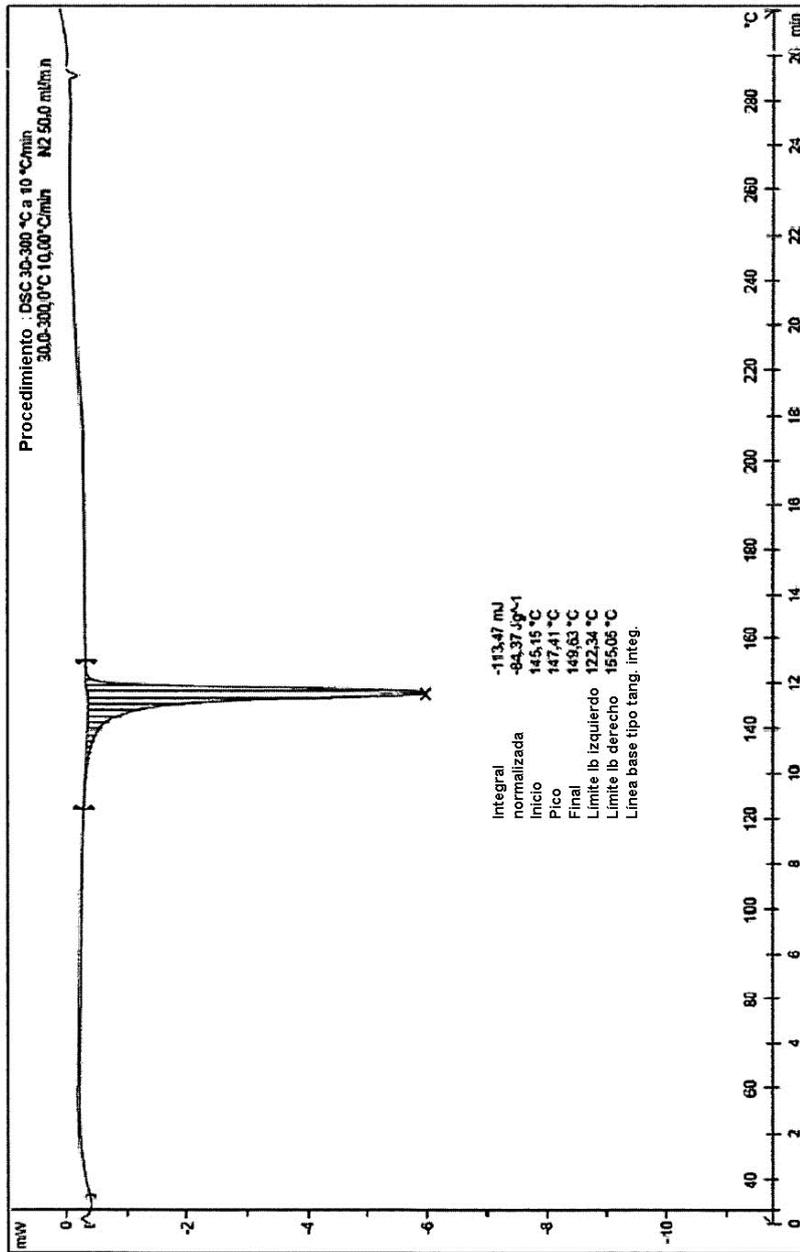


FIGURA 15

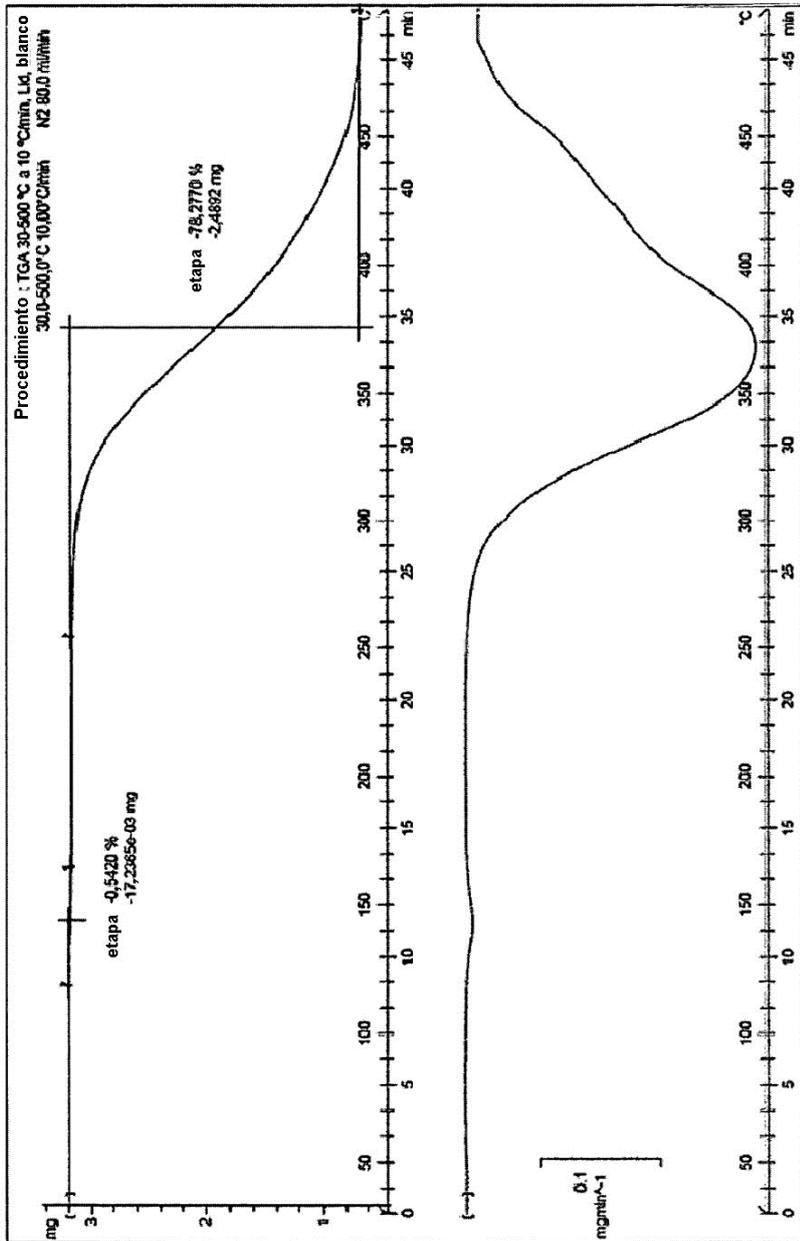
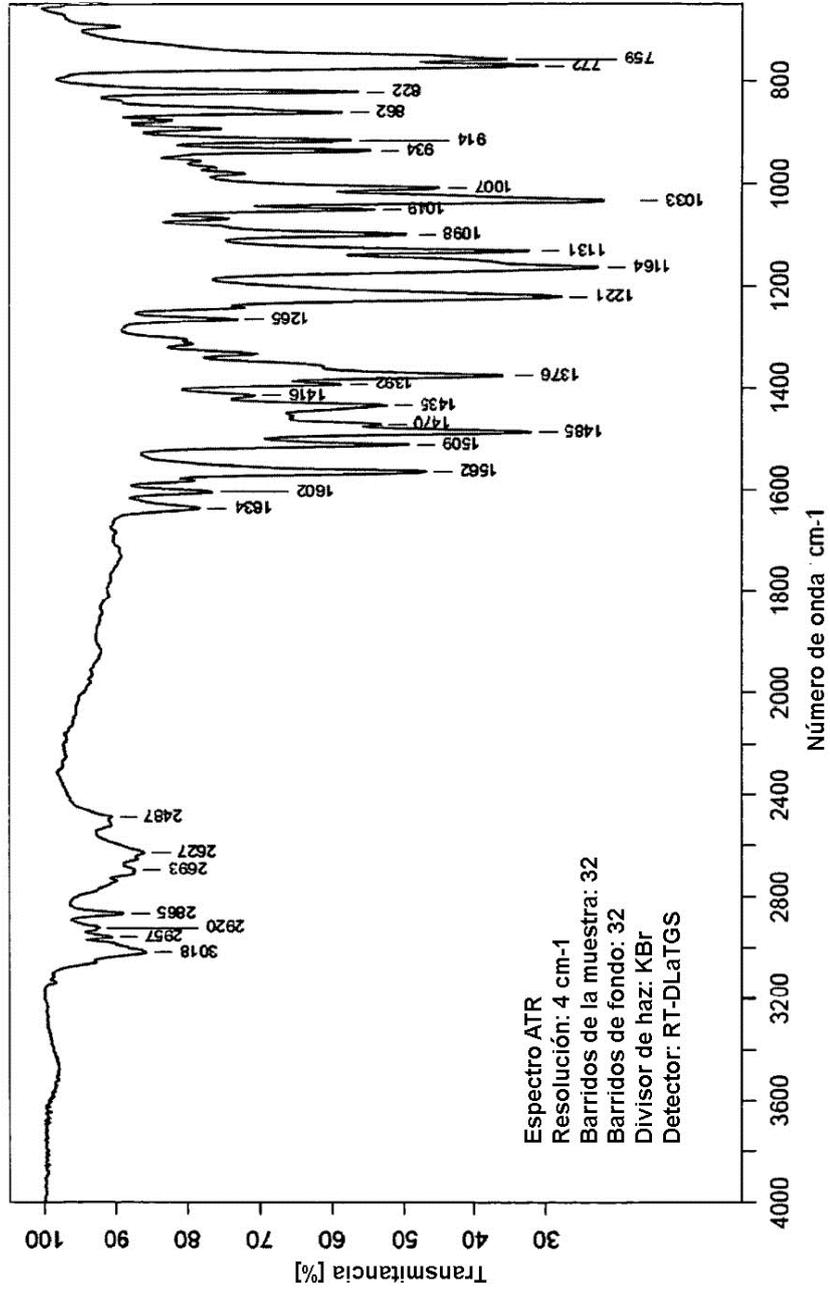


FIGURA 16



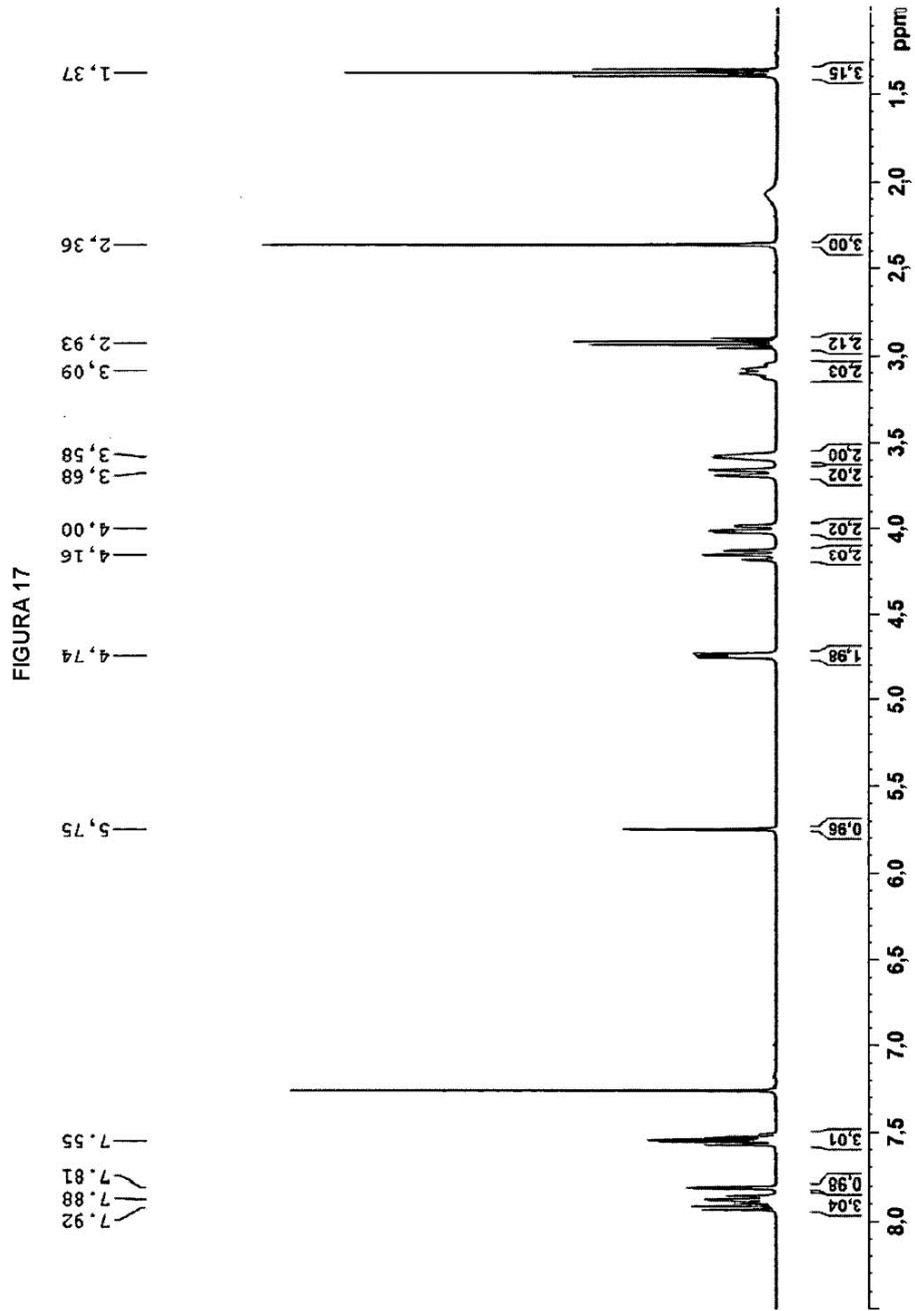


FIGURA 18

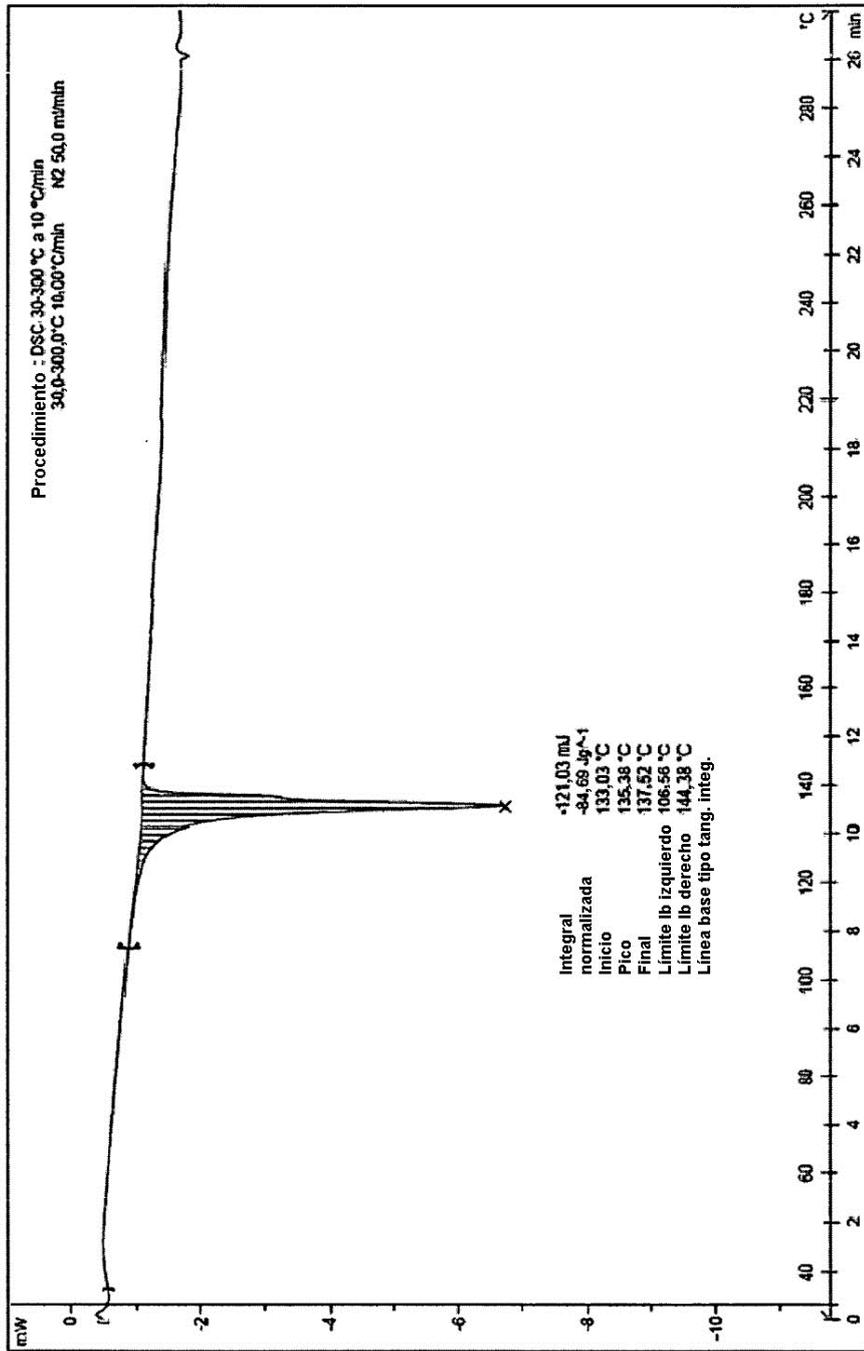
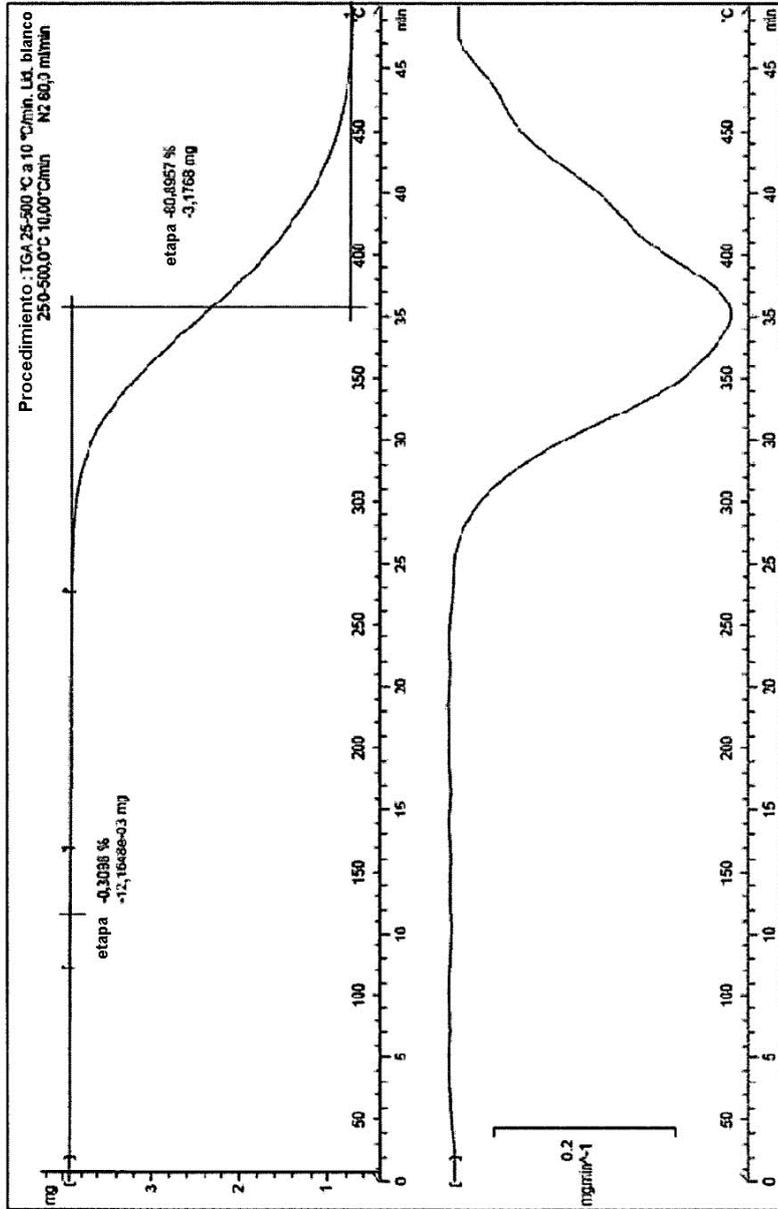
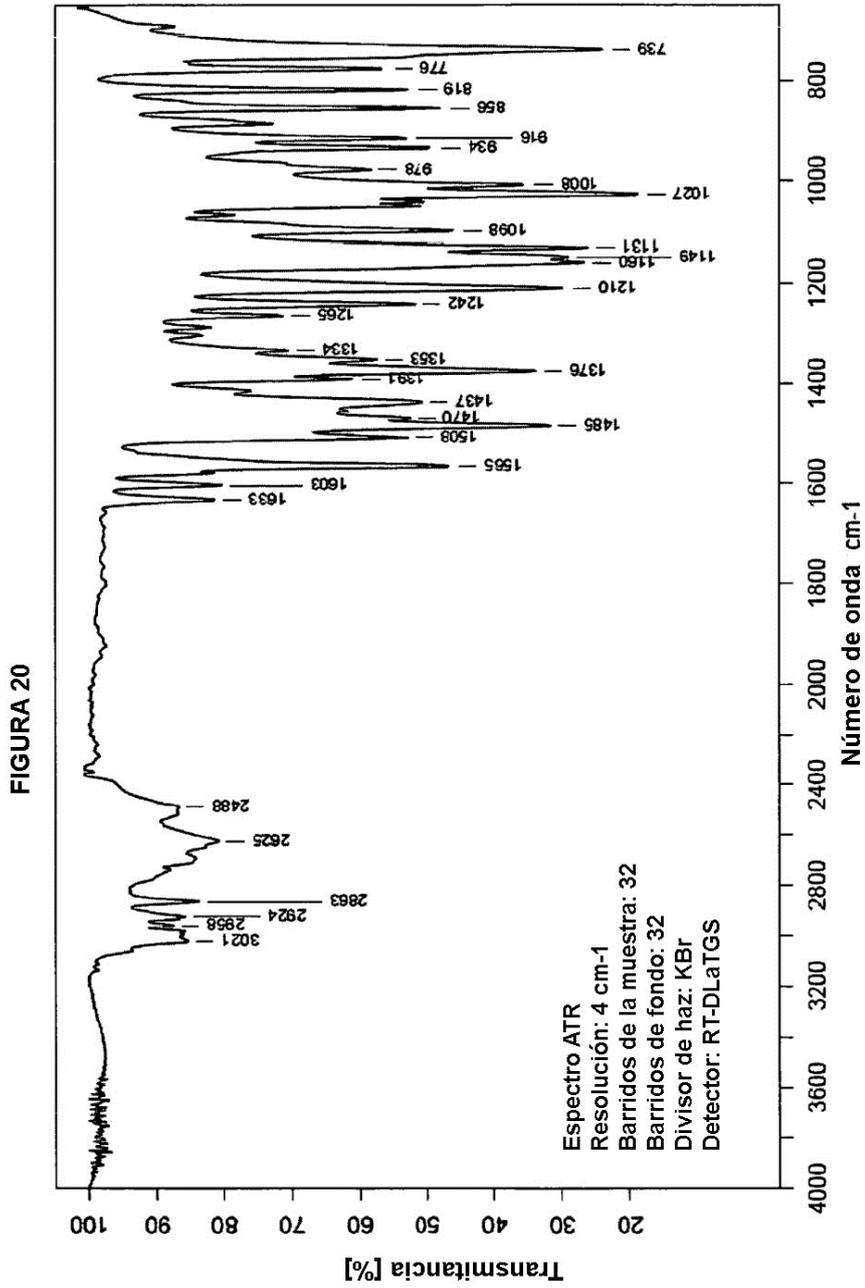


FIGURA 19





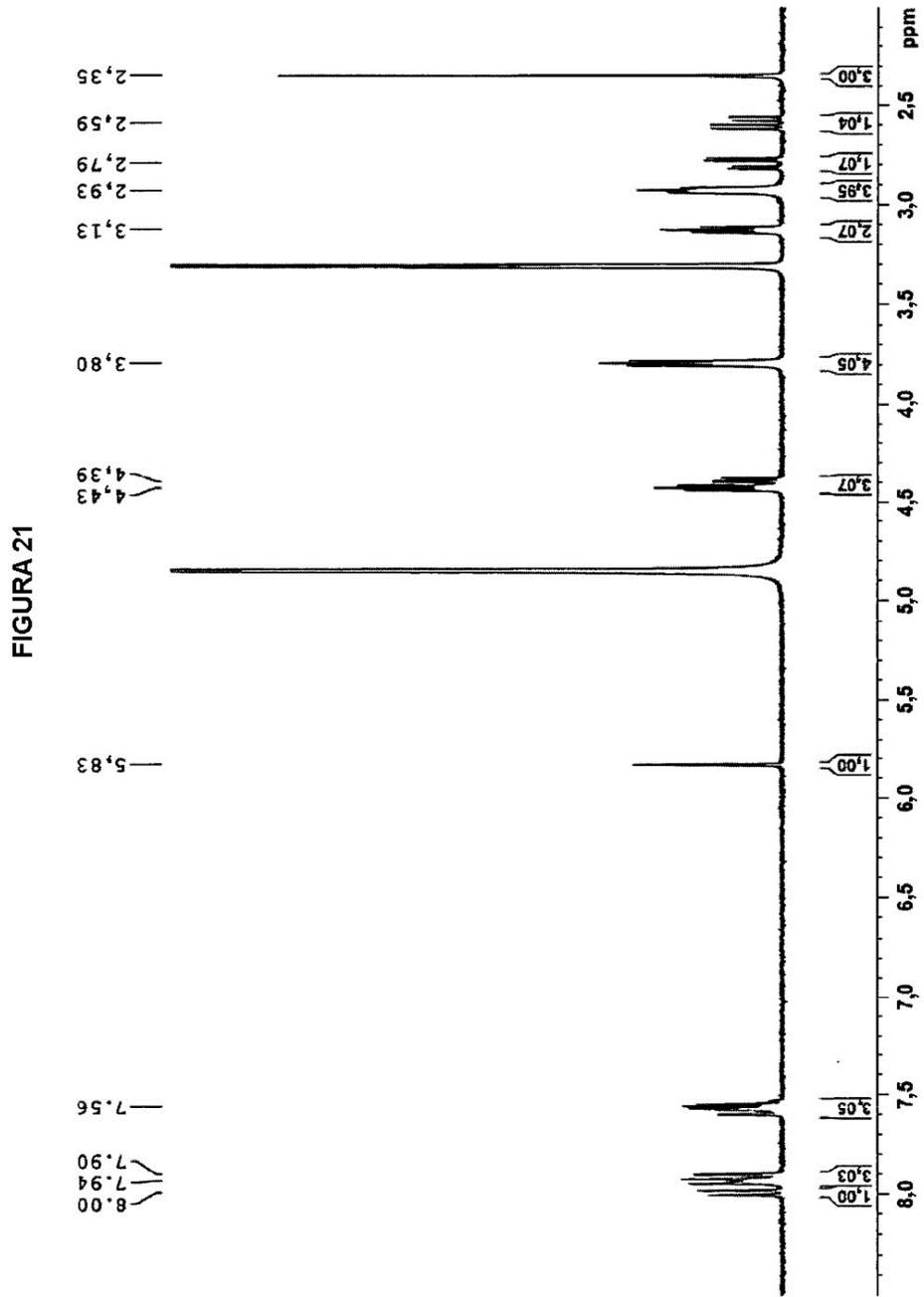


FIGURA 22

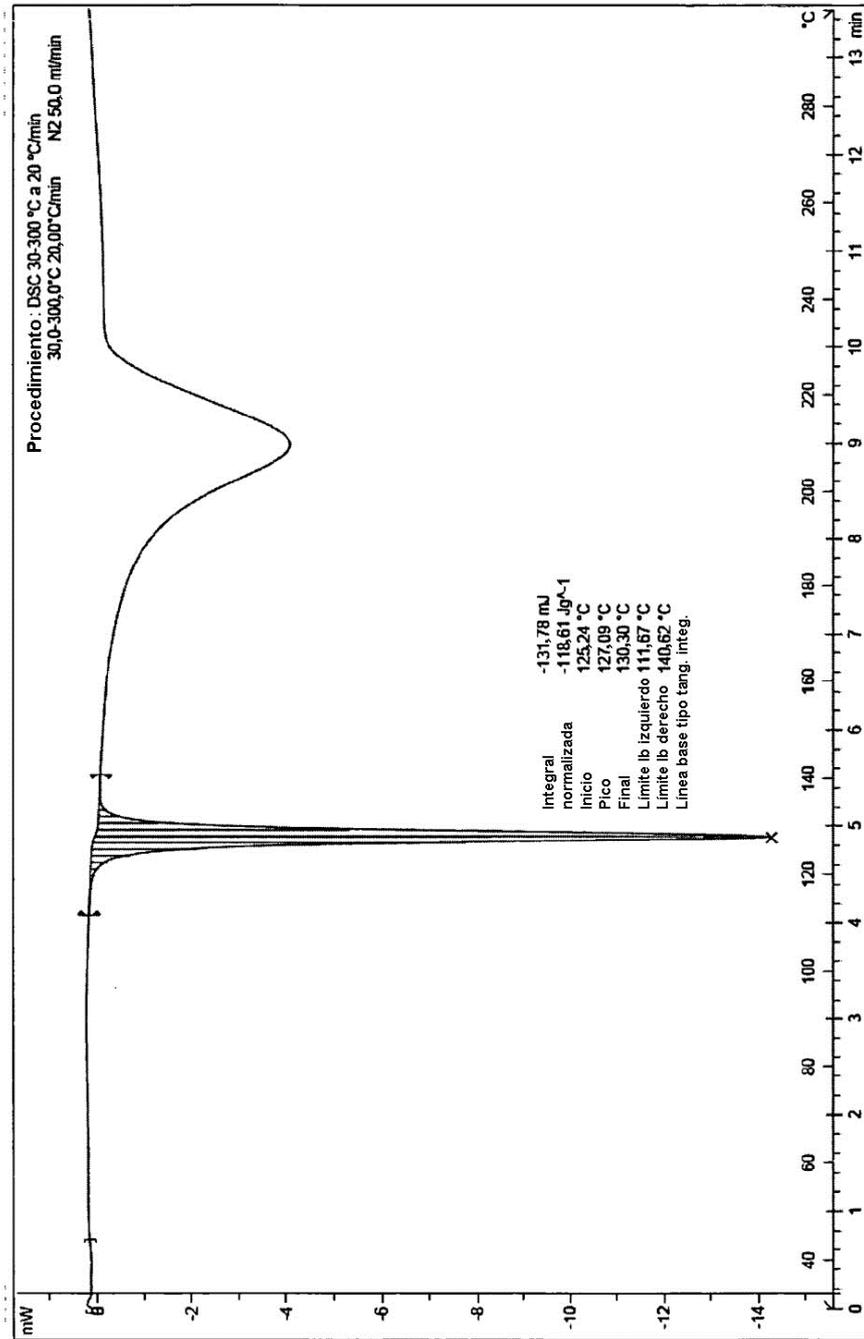


FIGURA 23

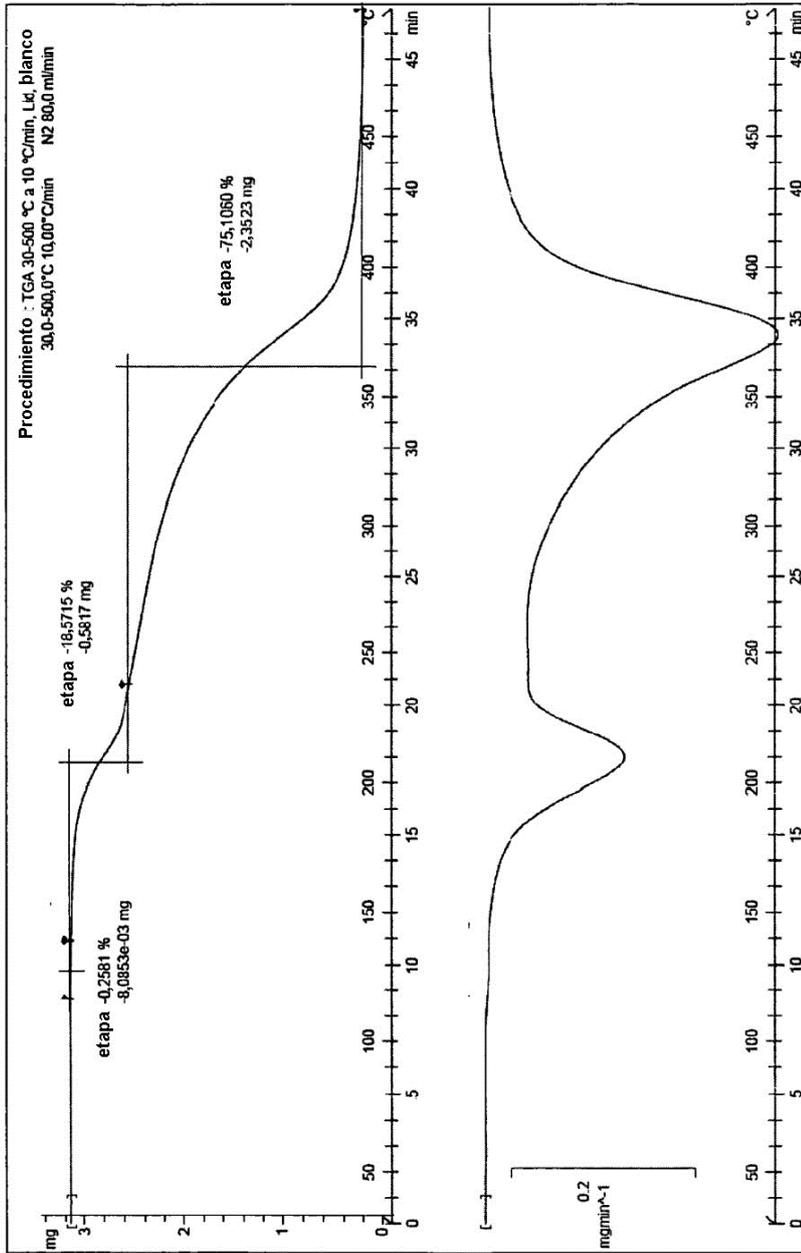
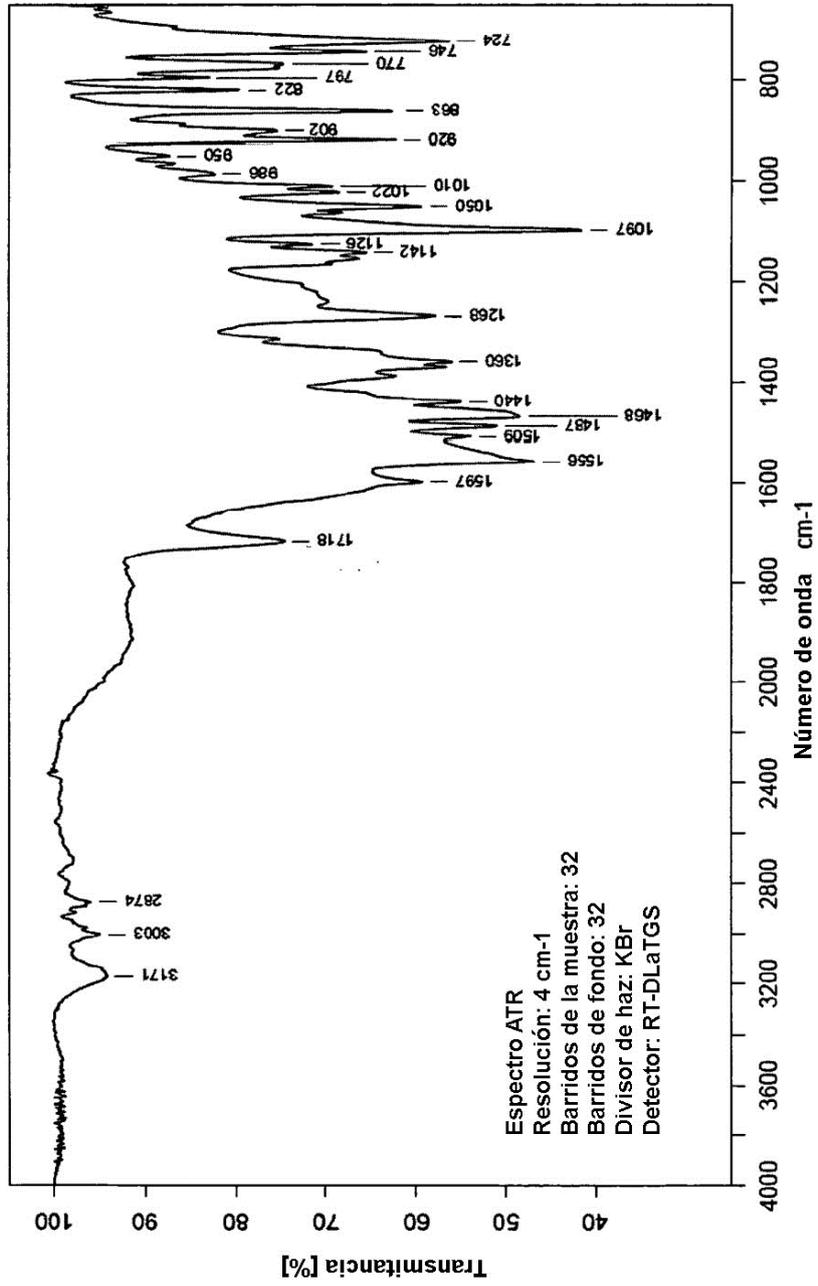


FIGURA 24



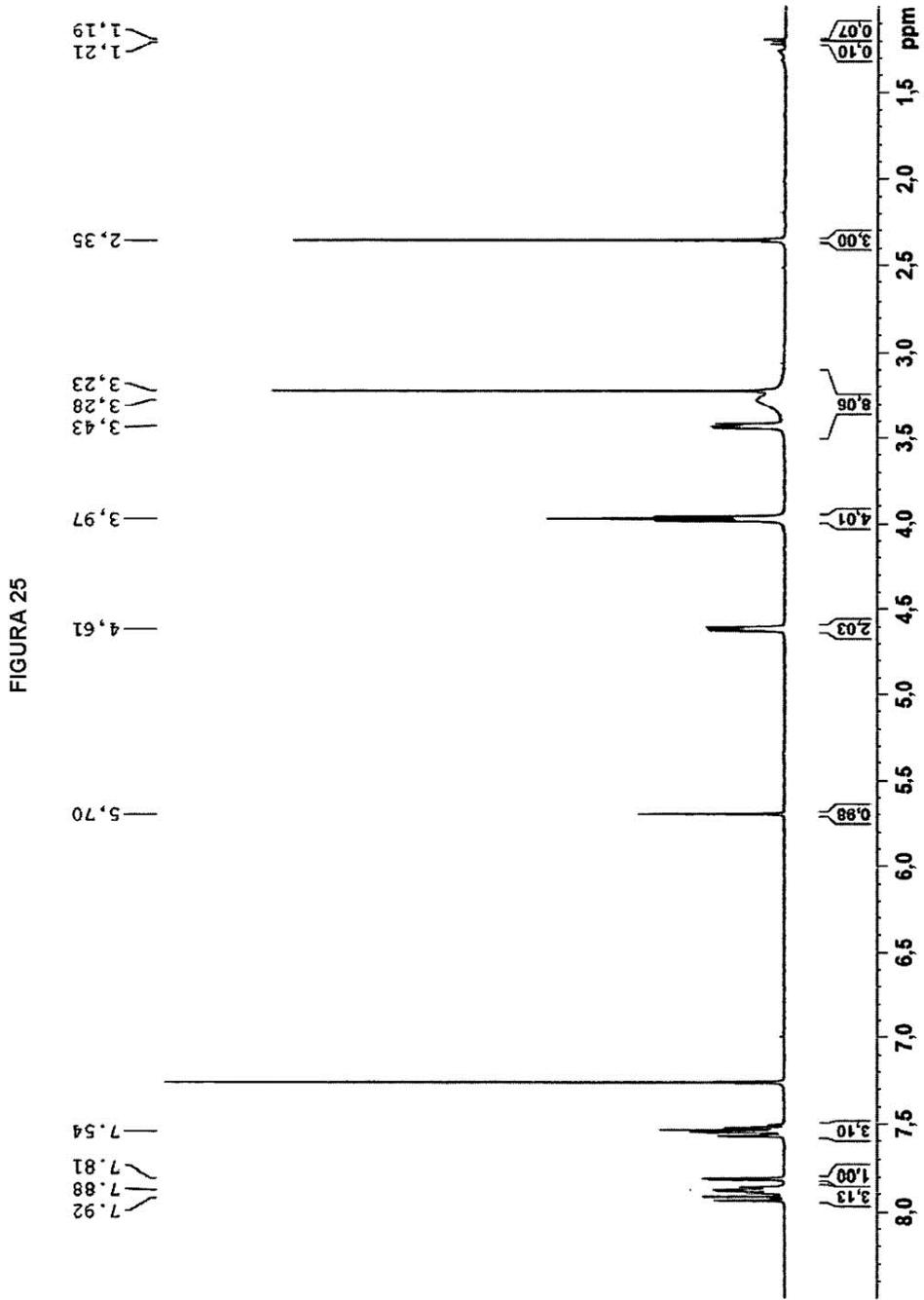


FIGURA 26

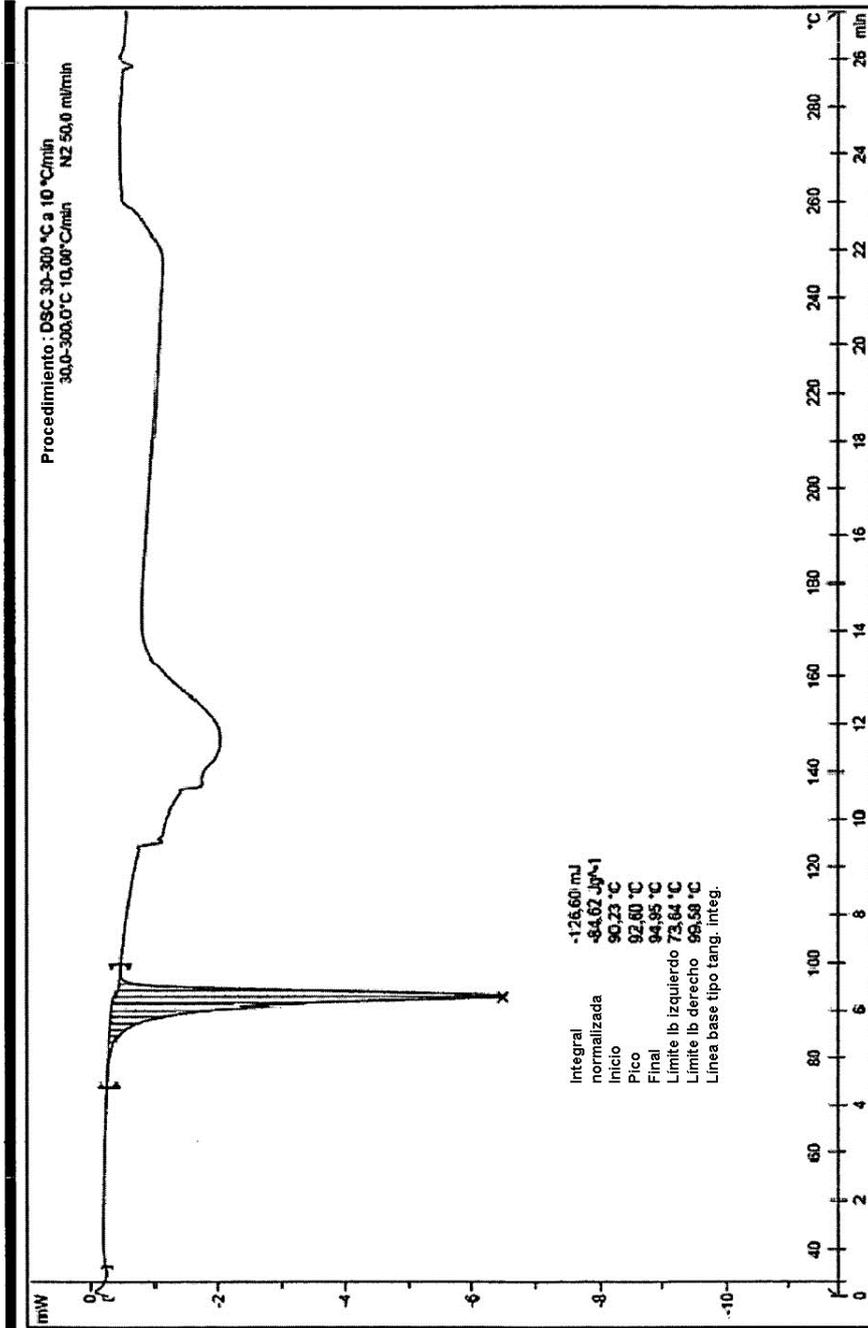


FIGURA 27

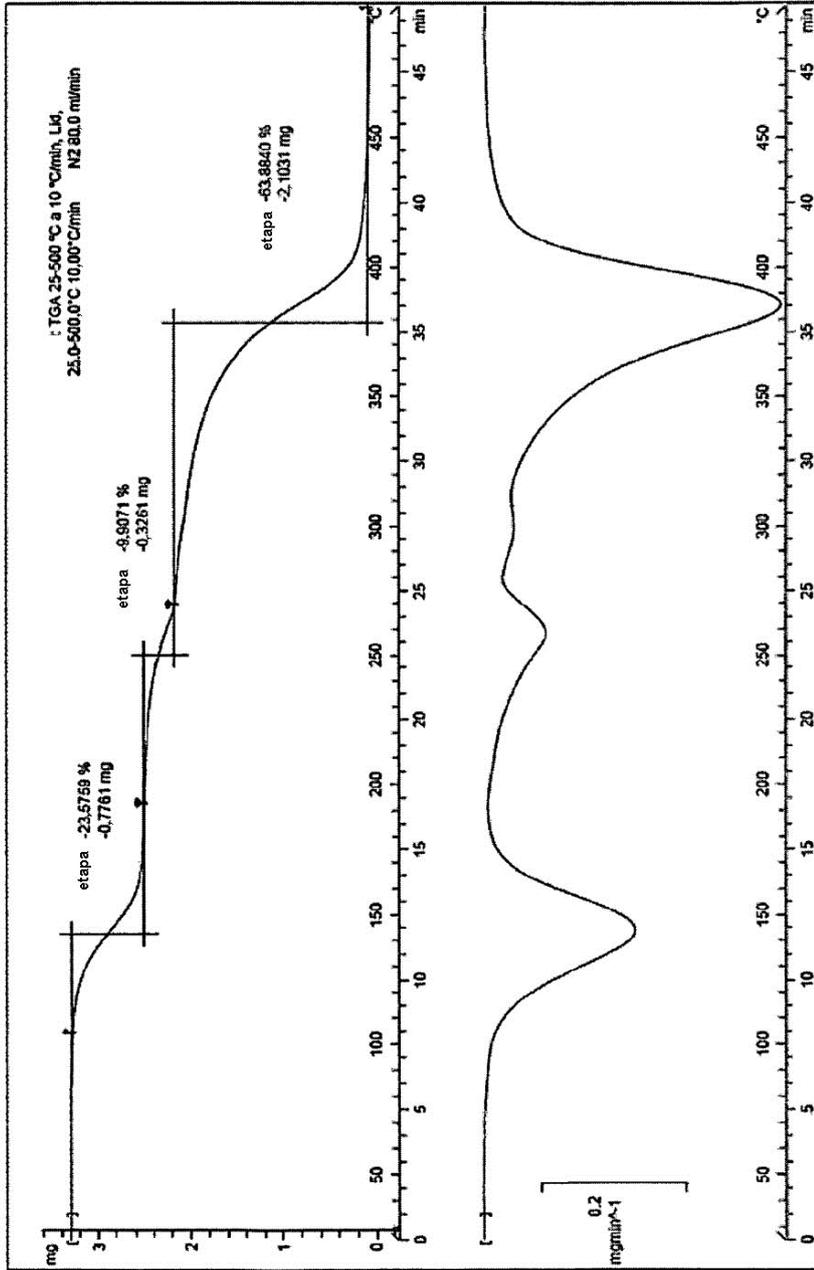


FIGURA 28

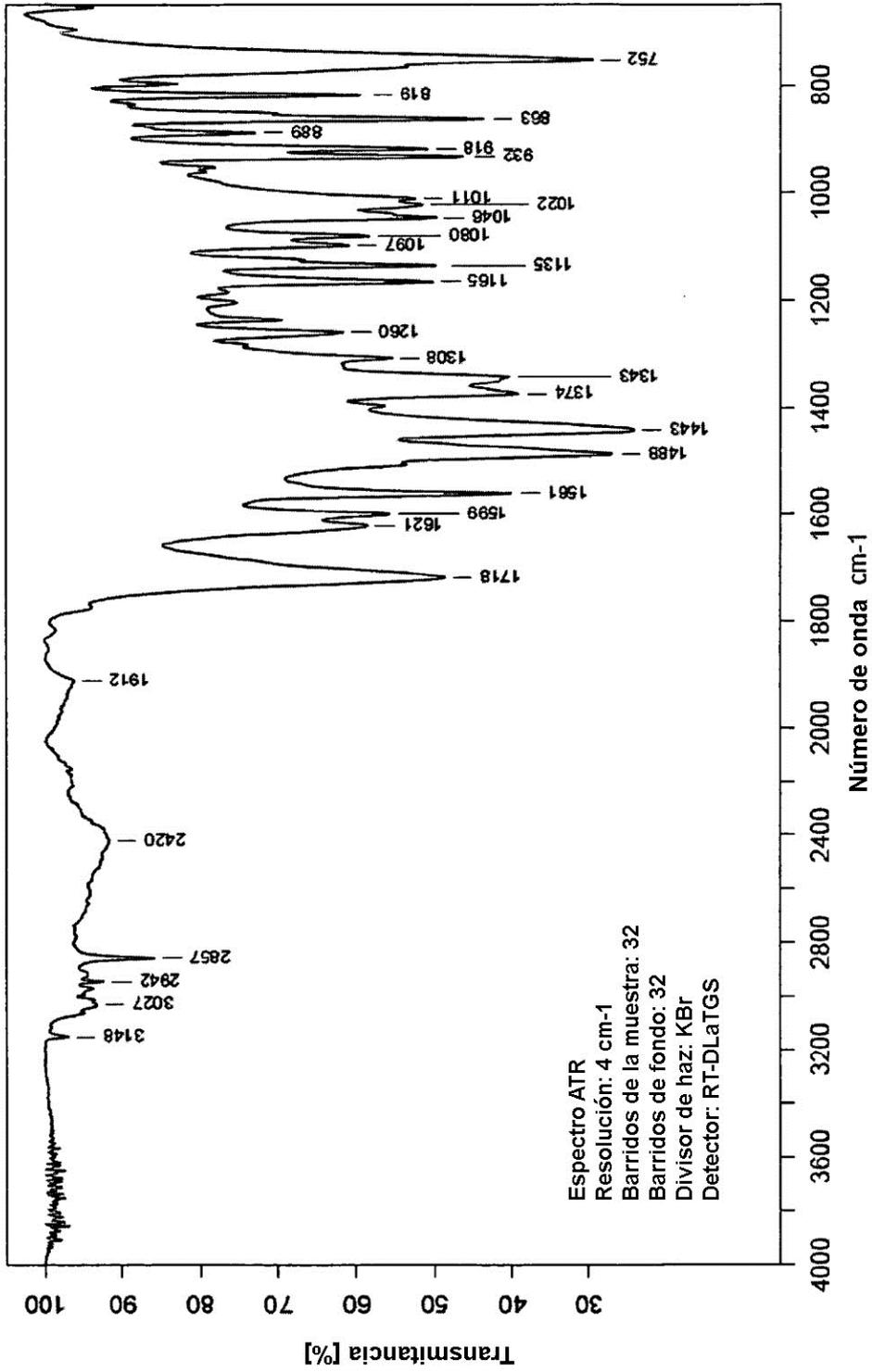


FIGURA 29

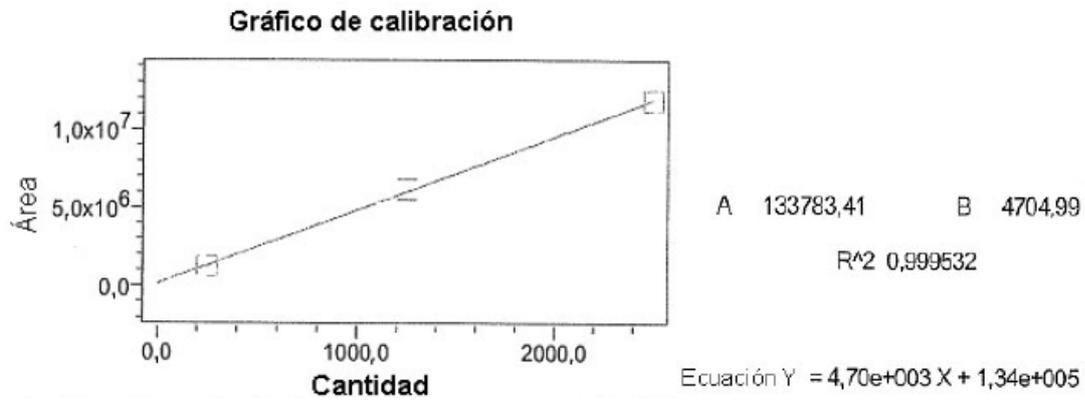


FIGURA 30

