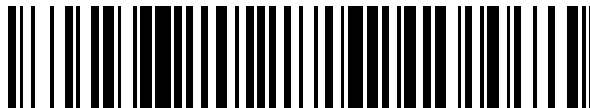


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 053**

51 Int. Cl.:

G01N 23/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2012 PCT/EP2012/059127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12725651 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2710355**

54 Título: **Procedimiento de detección de polimorfos que utiliza una radiación de sincrotrón**

30 Prioridad:

17.05.2011 EP 11166354

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

06.02.2017

73 Titular/es:

**ZETACUBE S.R.L. (100.0%)
Via Lillo del Duca, 10
20091 Bresso (Milano), IT**

72 Inventor/es:

**BRESCELLO, ROBERTO;
COTARCA, LIVIUS;
SMANIOTTO, ANNA;
VERZINI, MASSIMO;
POLENTARUTTI, MAURIZIO;
BAIS, GIORGIO y
PLAISIER, JASPER RIKKERT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 600 053 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

Procedimiento de detección de polimorfos que utiliza una radiación de sincrotrón.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de polimorfos que utiliza radiación de sincrotrón. En particular, la invención se refiere a un procedimiento de detección de polimorfos particulares en mezclas de compuestos polimórficos utilizando radiación de rayos X de una fuente de sincrotrón.

10 El procedimiento de la invención encuentra su aplicación en diferentes campos químicos y es particularmente útil en el campo farmacéutico. Puede utilizarse tanto con principios activos farmacéuticos (API) como con fármacos formulados tales como comprimidos, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos y similares. El procedimiento también puede utilizarse en otros campos en los que son importantes el polimorfismo y polimorfismo de solvato, tales como alimentos, pigmentos, cosméticos, agroquímicos, explosivos, etc.

15 La expresión “principio activo farmacéutico”, tal como se usa en la presente memoria, puede intercambiarse con “principio activo”.

20 Un “compuesto polimórfico”, o “polimorfo”, tal como se usa en la presente memoria, significa un compuesto que presenta más de una forma sólida. Por ejemplo, un compuesto polimórfico puede presentar diferentes formas de su estructura cristalina, o diferentes formas basadas en hidratación/solvatación, o puede presentar formas cristalinas y amorfas. Los sólidos amorfos consisten en disposiciones desordenadas de moléculas y no poseen una red cristalina distinguible. Como sólo un polimorfo es termodinámicamente estable a una temperatura y presión especificadas, todos los demás polimorfos pueden transformarse potencialmente en el polimorfo estable. Algunas transformaciones polimórficas son rápidas y reversibles, otras no lo son.

25 La forma de un compuesto puede presentar un impacto en actividad biológica. El mismo compuesto químico puede exhibir diferentes propiedades en función de la forma en la que esté ese compuesto (por ejemplo amorfa o cristalina). Por ejemplo, diferentes formas sólidas tienen diferente solubilidad. Como resultado, diferentes formas sólidas, incluyendo diferentes formas cristalinas, de un compuesto químico pueden presentar una mayor o menor eficacia para una aplicación particular. La identificación de una forma sólida óptima es importante en el campo farmacéutico, así como en otros campos tales como alimentos, nutracéuticos, agroquímicos, pigmentos, explosivos, etc.

35 En el campo farmacéutico es importante descubrir la forma de un compuesto químico que exhibe propiedades físicas y químicas apropiadas. Una forma puede ser más estable o presentar otras propiedades que la convierten en preferida sobre otras formas. Propiedades deseables pueden ser una mejor biodisponibilidad, una mejor solubilidad, o mejores características de adsorción.

40 Los procesos de fabricación y/o procesos de purificación están normalmente dirigidas a obtener un compuesto químico en la forma polimórfica óptima. Sin embargo, pueden formarse uno o más polimorfos que no exhiben las propiedades deseadas.

45 Como una forma polimórfica de un principio activo puede ser crítica para el rendimiento de un fármaco, las diferentes formas polimórficas pueden clasificarse como impurezas en un principio activo. Tales formas polimórficas se consideran por tanto contaminantes del principio activo deseado.

50 Los polimorfos de sólidos farmacéuticos pueden presentar diferentes propiedades químicas y físicas tales como reactividad química, estabilidad al aire y a la luz, solubilidad aparente, velocidad de disolución, propiedades ópticas y eléctricas. Estas propiedades pueden presentar un impacto directo en el procesado de principios activos y la calidad/rendimiento de fármacos, tales como estabilidad, disolución y biodisponibilidad y problemas de tratamiento tales como apelmazamiento, estática, densidad aparente, compresibilidad, dureza de comprimidos y fractura.

55 Las autoridades reguladoras pueden negarse a aprobar un fármaco genérico haciendo referencia a un fármaco listado si la solicitud contiene información insuficiente para mostrar que el principio activo es el “mismo” que el del fármaco listado de referencia. Un principio activo en un fármaco genérico se considera generalmente como el mismo que el principio activo en el fármaco listado de referencia si cumple con las mismas normas para la identidad. Como el rendimiento del fármaco depende de la formulación del producto, el principio activo en un fármaco genérico propuesto no presenta que presentar la misma forma física (tamaño de partícula, conformación, o forma de polimorfo) que el principio activo en el fármaco listado de referencia. Como los polimorfos pueden exhibir ciertas diferencias en atributos físicos y de química de estado sólido (reactividad) que están relacionados con estabilidad y biodisponibilidad es esencial, sin embargo, que el desarrollo de producto y el proceso de revisión regulatorio presten especial atención a este tema. Este examen se requiere para garantizar que las diferencias polimórficas (cuando están presentes) se aborden correctamente a través del diseño y control de formulación y condiciones de proceso para garantizar la estabilidad física y química del producto durante la vida útil, así como la biodisponibilidad/bioequivalencia.

65

El desarrollo de procedimientos para detectar y/o determinar la pureza polimórfica de un principio activo es por tanto una tarea importante de la industria farmacéutica.

5 El documento US 6.750.064 B2 da a conocer procedimientos de detección de posibles formas sólidas de una sustancia, particularmente una sustancia farmacéutica. Se describen varios procedimientos analíticos, incluyendo el análisis de difracción de rayos X.

10 Los patrones de difracción de rayos X proporcionan una herramienta poderosa para analizar diferentes formas cristalinas o forma amorfa de una sustancia. El análisis de difracción de rayos X se utiliza por tanto extensamente para identificar polimorfos en un principio activo. Sin embargo, la resolución e intensidad de fuentes de rayos X convencionales limitan el análisis de difracción de rayos X y pueden no permitir la identificación y/o determinación de pequeñas cantidades de un polimorfo en una mezcla, o la identificación y/o determinación de la presencia de un polimorfo cuando sus picos de difracción se solapan con los picos de otro polimorfo, particularmente si este último está presente en una cantidad mayor.

15 Aunque la difracción de rayos X de polvo es uno de los procedimientos analíticos más útiles y más extensamente utilizados para determinar polimorfos y cuantificar las formas presentes en una mezcla, la determinación del límite de detección se hace crítica en el análisis de mezclas, particularmente con respecto a la sensibilidad para detectar pequeñas cantidades de una fase dada en relación con otra presente en una cantidad mayor. Pequeños cambios en los patrones de polvo de rayos X debido al aspecto de nuevo(s) pico(s), hombros o desplazamientos adicionales en la posición de pico a menudo implican la presencia de un nuevo polimorfo, pero surge ambigüedad en los datos debido a la resolución y sensibilidad insuficientes.

20 El documento WO 01/82659 A1 da a conocer procedimientos para la detección de alto rendimiento de polimorfos utilizando una fuente de rayos X de sincrotrón. Los procedimientos descritos en tal documento están encaminados a obtener un gran número de patrones de difracción de polvo a partir de pequeñas cantidades de material como parte de un esfuerzo para identificar en qué forma polimórfica se ha producido un candidato de fármaco potencial mediante un método sintético particular. En particular, los procedimientos están diseñados para permitir la velocidad rápida a la que pueden leerse los datos del detector, de modo que pueden utilizarse tamaños de muestra pequeños y tiempos de irradiación cortos, permitiendo el análisis de alto rendimiento de miles de muestras al día. Debido a esto, los datos de difracción obtenidos no necesitan ser de una calidad concreta para resolver la estructura cristalina del compuesto de muestra.

25 Varasteh M. *et al.*: "Quantitative determination of polymorphic impurity by X-ray powder diffractometry in an OROS® formulation", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 366 (2009) 74-81, da a conocer la determinación de polimorfos A y B en un sistema de administración de fármaco de Alza Oros® mediante varios procedimientos analíticos, incluyendo difracción de polvo de rayos X (XRD). Los autores mencionaron que también se ha ido desarrollando un procedimiento de radiación de sincrotrón para cuantificar la cristalinidad en productos farmacéuticos sustancialmente amorfos. Aunque tal procedimiento de radiación de sincrotrón no se describe en detalle, supuestamente no está destinado a detectar o determinar polimorfos, e incluso menos para detectar/determinar pequeñas cantidades de polimorfos en productos que contienen grandes cantidades de otro polimorfo del mismo compuesto.

40 Brett Cooper V. *et al.*: "Quantification of crystalline forms in active pharmaceutical ingredients and tablets by X-ray diffraction", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 55, (2003); 1323-1329, da a conocer la caracterización de polimorfos de un API en desarrollo mediante XRD convencional.

45 El documento WO 02/052919 A2 da a conocer un procedimiento de búsqueda de formas sólidas y detección de una muestra según su forma usando rayos X a partir de una fuente de sincrotrón. El procedimiento está encaminado a generar la mayoría de formas sólidas posibles de un compuesto con el propósito de detectar e investigar tales formas. Con este propósito, el procedimiento enseña a cristalizar o solidificar un compuesto de una muestra en la que el compuesto no está en una forma sólida directamente en un capilar u otro receptáculo adecuado para análisis de rayos X. Los ejemplos describen introducir disoluciones del compuesto orgánico que va a investigarse en un capilar, entonces evaporar el disolvente de modo que se forman varias formas cristalinas. El procedimiento no aborda el problema de detección de pequeñas cantidades de polimorfos en productos que contienen grandes cantidades de otro polimorfo del mismo compuesto.

50 Por tanto, permanecen varias desventajas de, o problemas no resueltos por, los procedimientos dados a conocer en las referencias mencionadas.

60 Además, ninguno de estos procedimientos presenta en cuenta:

(i) los posibles efectos de la radiación en la muestra, que pueden dañar la muestra, provocar un empeoramiento de la calidad de los datos y cambiar la naturaleza polimórfica de la muestra;

65 (ii) cómo la forma de la muestra (por ejemplo polvo, comprimido, crema, suspensión) determina/requiere

diferentes estrategias de medición para minimizar la pérdida en resolución y/o precisión debido a la extensión espacial de la muestra y para maximizar la calidad de los datos;

- 5 (iii) cómo la divergencia de haz menor, intrínseca a la radiación de sincrotrón y diferente de fuentes convencionales, contribuye a la resolución y sensibilidad de datos, reduciendo por tanto la extensión angular en los picos difractados, aumentando la relación señal/ruido y reduciendo el posible solapamiento de picos.

10 Se ha descubierto que tener es obligatorio en cuenta estos factores para garantizar una correcta detección de polimorfos presentes en pequeñas cantidades o que exhiben patrones de difracción de rayos X que se solapan con otros polimorfos presentes en una muestra.

Por tanto, es necesario un procedimiento más sensible para detectar polimorfos particulares en mezclas de compuestos polimórficos.

- 15 También, es necesario un procedimiento más sensible para detectar polimorfos particulares, que sea eficaz, fiable y comercialmente viable.

La presente invención aborda esta necesidad proporcionando un procedimiento según la reivindicación 1.

- 20 El procedimiento de la invención es particularmente ventajoso para detectar la presencia y/o determinar la cantidad de una forma polimórfica no predominante de un compuesto orgánico polimórfico, más particularmente un principio activo.

- 25 El procedimiento de la invención se dirige en particular a la detección y/o determinación de un polimorfo en una mezcla que comprende otros polimorfos y posiblemente otros ingredientes o componentes.

- 30 En la presente descripción la expresión "detección de un polimorfo" significa identificar tal polimorfo desde un punto de vista cualitativo, mientras que la expresión "determinación de un polimorfo" significa cuantificar la cantidad de tal polimorfo en una mezcla o composición.

- 35 En la presente descripción la expresión "forma polimórfica no predominante" o "polimorfo no predominante" significa un polimorfo que está presente en una mezcla o composición en una cantidad inferior a la cantidad de un polimorfo diferente, mientras que la expresión "forma polimórfica predominante" o "polimorfo predominante" significa un polimorfo que está presente en una mezcla o composición en una cantidad superior a la cantidad de cualquier otro polimorfo en la mezcla o composición.

- 40 Aunque la presente invención no está limitada a una cantidad particular de un polimorfo no predominante en una mezcla, la cantidad de un polimorfo no predominante en una mezcla de polimorfos de un producto farmacéutico puede ser pequeña o muy pequeña. Por ejemplo puede ser inferior al 5%, o inferior al 0,5%, o incluso inferior al 0,005% en peso.

- 45 La presente invención también aborda la necesidad de proporcionar un procedimiento de detección de la ausencia de una forma polimórfica no predominante de un compuesto polimórfico en presencia de una o más formas polimórficas predominantes.

- En el análisis de difracción de rayos X de polvos, las señales observadas de una pequeña cantidad de una molécula farmacéutica son normalmente débiles. Se requiere una fuente de rayos X extremadamente intensa para aumentar las intensidades de las señales y el límite de detección.

- 50 La radiación de sincrotrón se genera cuando partículas cargadas viajan a lo largo de trayectorias curvas a velocidades cercanas a la de la luz. La curvatura se produce por campos magnéticos. La velocidad de las partículas e intensidad de estos campos determina la distribución espectral de la radiación electromagnética producida. En general, está disponible un espectro que oscila desde rayos X de longitud de onda corta, por ejemplo $< 0,1 \times 10^{-10} \text{ m}$ (= 0,1 Å) hasta el ultravioleta (por ejemplo 200 nm = 2000 Å). A diferencia de fuentes de rayos X convencionales, la fuente de sincrotrón ofrece una potencia radiada superior (esencial para muestras que contiene una cantidad pequeña o muy pequeña de polimorfos predominantes y no predominantes), la posibilidad de seleccionar diferentes longitudes de onda específicas (esencial para reducir absorción de muestra, fluorescencia de muestra, señal de fondo de difracción, daño de muestra), divergencias más pequeñas (esencial para aumentar la relación señal/ruido y la resolución de picos adyacentes) y estado de polarización bien definido.

- 60 El procedimiento de la invención se basa en el análisis de difracción de rayos X que utiliza radiación de sincrotrón y permite la detección de cantidades muy pequeñas de polimorfos en una muestra, incluso cantidades a nivel de impurezas, tales como el 0,005 %, tal como se mencionó anteriormente.

- 65 El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo en una muestra que contiene esencialmente sólo un compuesto que comprende una o más formas polimórficas, o en una muestra de una composición o producto

formulados, en particular una muestra que contiene un compuesto que comprende una o más formas polimórficas y otros ingredientes o componentes.

5 El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo en una muestra de polvo suelto o polvo compacto o una muestra conformada tal como un comprimido o similar, o en una formulación en la que el compuesto polimórfico sólido se suspende, dispersa o mezcla con un líquido. Ejemplos de tales formulaciones son suspensiones, emulsiones, cremas, geles, ungüentos y similares.

10 El procedimiento de la invención también puede llevarse a cabo sin retirar el producto que va a analizarse de su envase (por ejemplo un producto farmacéutico y su blíster).

El procedimiento de la invención también puede llevarse a cabo en una muestra que también comprende excipientes y otros ingredientes (por ejemplo comprimidos de un producto farmacéutico).

15 La alta energía de la radiación utilizada requiere una manipulación y/o tratamiento apropiado de la muestra. Se requieren pruebas preliminares con radiación de sincrotrón para encontrar posibles daños o alteración (por ejemplo, descomposición, deshidratación, transición polimórfica) de la muestra debido a la radiación.

20 Un patrón de difracción de rayos X dibuja la intensidad de los rayos X dispersados (I) como una función del ángulo de difracción (2θ). Como cada material cristalino presenta una estructura característica, difracta rayos X en un patrón característico único. Por tanto diferentes estructuras cristalinas exhiben diferentes patrones de difracción de rayos X, que identifican cada estructura. Picos de marcadores están presentes en ángulos de difracción dados y se registran y almacenan como datos de referencia para cada compuesto y/o polimorfo.

25 Como parte de las etapas preliminares que van a llevarse a cabo en el procedimiento de la invención, se recogen y almacenan patrones de difracción de rayos X del/de los polimorfo(s) que van a investigarse.

30 También, el funcionamiento correcto del sistema de detección de rayos X se comprueba a través de calibración de longitud de onda y calibración de parámetros espaciales que definen la posición del detector con respecto a la posición de la muestra que va a analizarse. Se utilizan sistemas de referencia estándares para ambas calibraciones.

35 La etapa (A) del procedimiento según la invención es la de proporcionar una muestra que comprende el compuesto polimórfico que va a analizarse en forma de polvo o en una forma sólida conformada o en una forma en la que el compuesto polimórfico sólido se suspende, dispersa o mezcla con un líquido. Tal como se dio a conocer anteriormente, "forma conformada" significa una forma en la que la muestra presenta una forma suficientemente estable para mantenerse en condiciones ambientales normales, tal como la conformación de un comprimido o una cápsula. Si la muestra es un polvo, una suspensión, emulsión, gel, crema, ungüento y similar, puede colocarse en un capilar adecuado de cuarzo/Kaptón/borosilicato (o materiales apropiados similares) u otro soporte/recipiente de tamaño adecuado para el análisis de rayos X. También pueden utilizarse muestras molidas o micronizadas. Si la muestra es una muestra conformada, por ejemplo un comprimido, se utiliza como tal. Tal como se mencionó anteriormente, la muestra puede dejarse en el envase o blíster que la contiene. En este caso se recoge solamente un patrón de difracción de rayos X del blíster, u otro recipiente similar, en condiciones experimentales similares y se utiliza como referencia para el análisis de la muestra.

45 Como el procedimiento está diseñado para detectar la presencia o ausencia de una pequeña cantidad de un polimorfo en una muestra que contiene una gran cantidad de otro polimorfo, la muestra que va a analizarse es normalmente un compuesto o una mezcla en la que un compuesto polimórfico deseado puede estar asociado a una cantidad más pequeña de un polimorfo no deseado. Esto puede suceder por ejemplo si el procedimiento de producción del compuesto polimórfico deseado (la "forma polimórfica predominante") produce como un producto secundario o impureza un compuesto polimórfico no deseado (la "forma polimórfica no predominante").

50 La etapa (B) del procedimiento es la de proporcionar información de referencia a partir del análisis de XRD sobre la posición de picos de marcadores de la forma polimórfica no predominante de un compuesto en una gráfica de intensidad frente a ángulo de dispersión en relación con picos de una o más formas polimórficas predominantes. Esto significa que patrones de difracción de rayos X de cada polimorfo o ingrediente que va a investigarse están disponibles como datos de referencia y se proporcionan al analista que lleva a cabo el procedimiento, o a un sistema automatizado que está programado para llevar a cabo el procedimiento.

60 La etapa (C) del procedimiento es la de proporcionar un haz de una radiación de sincrotrón de una fuente de sincrotrón. Se selecciona un haz de rayos X de una fuente de sincrotrón con una longitud de onda en el intervalo de desde 0,5 hasta 3,0 Å teniendo en cuenta brillo máximo, absorción de muestra, daño por radiación, fluorescencia de muestra. Preferentemente dicha radiación de sincrotrón presenta una longitud de onda en el intervalo de desde 0,8 hasta 1,5 Å.

65 Aunque la radiación de sincrotrón no está fácilmente disponible como una fuente de rayos X convencional, varias fuentes de radiación de sincrotrón están disponibles en Europa, Estados Unidos, y otros países con instalaciones de

I+D avanzadas.

La etapa (D) del procedimiento comprende exponer la muestra que va a analizarse al haz de radiación de sincrotrón con un tamaño de punto en la muestra de desde 100 μm^2 hasta 0,1 cm^2 , seleccionándose dicho tamaño de punto utilizando rendijas o micro-orificios.

En la siguiente descripción la etapa de exponer la muestra al haz de rayos X se denomina "medida" o "medición" o "muestreo", aunque, de manera rigurosa, la medición también incluye la recogida de los datos y su procesamiento hasta un patrón de difracción final. Las muestras que van a analizarse se exponen normalmente a una radiación de sincrotrón que presenta preferentemente una longitud de onda en el intervalo de 0,8 a 1,5 Å y preferentemente un tamaño de punto en la muestra variable de desde 200 μm hasta 300 μm en diámetro, para evaluar la potencia de difracción de la muestra y seleccionar parámetros de recogida apropiados.

Los parámetros que van a seleccionarse incluyen de manera no limitativa:

- resolución angular mínima y máxima deseada;
- tiempo de exposición, para no superar el intervalo dinámico del detector pero todavía obtener señales suficientes de los picos de difracción, incluyendo los picos más débiles;
- tamaño del haz, de modo que se mide tanta muestra como sea posible y se aumenta la intensidad de los picos de difracción, teniendo en cuenta el ensanchamiento de picos de difracción debido a muestras sobre-extendidas;
- longitud de onda utilizada, de modo que se minimiza la absorción de rayos X en la muestra y se maximiza la difracción con la muestra. La elección de la longitud de onda también debe minimizar y posiblemente eliminar cualquier contribución de la posible fluorescencia de la muestra ya que puede reducir la calidad de datos obtenidos. También afecta a la resolución mínima y máxima deseada, así como a la distancia entre el detector y la muestra. Además la elección de longitud de onda determina el nivel de fondo de dispersión y por tanto la calidad de los datos.
- Distancia muestra-detector. Ésto debe principalmente garantizar la posibilidad de que se resuelvan los picos de difracción. La variación de este parámetro también afecta a la resolución angular mínima y máxima.
- Posición del supresor de haz, de modo que se minimiza la sombra producida por el supresor de haz en el detector para mejorar el ángulo de dispersión mínimo de los datos recogidos, así como para minimizar el fondo registrado por el detector debido a la interacción de rayos X y aire. Una posición óptima del supresor de haz mejora la relación señal/ruido de los datos.

La etapa (E) del procedimiento comprende comprobar la extensión del posible daño provocado por la exposición de la muestra a la radiación de sincrotrón; la zona seleccionada en la muestra se expone durante diferentes intervalos de tiempo al haz de rayos X. Los intervalos de tiempo se eligen como fracciones del tiempo de exposición seleccionado (etapa D) para monitorizar posibles daños de radiación durante una única medición con los parámetros seleccionados. También se monitorizan intervalos más largos para resaltar el posible daño de radiación tras exposiciones prolongadas. Durante estos intervalos de tiempo se registran patrones de difracción de rayos X y la correlación entre ellos se utiliza para evaluar la cantidad de daño de radiación. Esto proporciona un tiempo de exposición máximo estimado sin daño. Si es necesario, se cambia consecuentemente el tiempo de exposición elegido (etapa D).

Cuando se seleccionan los parámetros óptimos, se mantienen constantes durante el funcionamiento del procedimiento de modo que se evita cualquier variación que pudiera afectar la comparabilidad de los datos.

La etapa (F) del procedimiento comprende recoger la intensidad y dirección de dispersión de la radiación difractada utilizando un detector de rayos X que dirige el haz de rayos X que presenta las características seleccionadas sobre la muestra. Durante la medición, la muestra puede moverse alrededor de uno o más ejes con respecto al haz de rayos X para equilibrar posibles faltas de homogeneidad en la orientación de cristalitas en el volumen de muestra abarcado por el haz. Se evalúan y seleccionan la medida y el grado de tal movimiento (en general una rotación, véase la figura 1 como ejemplo en un capilar) durante la exposición de rayos X.

La radiación dispersada (o difractada) se registra con un detector de rayos X de área. La imagen resultante obtenida a través del detector consiste en una matriz cuyo tamaño depende del tipo y modelo del detector, en el que cada elemento de la matriz registra un valor relacionado con la cantidad de rayos X difractados en una cierta dirección del espacio. Los valores de la matriz se encuentran en un formato de archivo apropiado, normalmente una imagen adecuada que va a visualizarse mediante un sistema informático. Opcionalmente puede utilizarse un detector puntual o de línea para obtener las intensidades de difracción y direcciones de dispersión.

- La etapa (G) del procedimiento comprende mover una o más veces la muestra que va a analizarse con respecto al haz de radiación de sincrotrón. Esto permite exponer diferentes zonas de la muestra a la radiación y equilibrar posibles faltas de homogeneidad de la muestra. Se realizan por tanto varias mediciones para cada muestra, de manera manual o automatizada, en diferentes partes de la muestra para mejorar la estadística de los datos. Tales mediciones se realizan generalmente en un tubo capilar si la muestra es un polvo cristalino suelto o en una forma en la que el compuesto polimórfico sólido está suspendido, dispersado o mezclado con un líquido. Las mediciones se realizan directamente en la muestra si ésta está en una "forma conformada" tal como se definió anteriormente (por ejemplo un comprimido). El número total de mediciones recogidas en una muestra es tal que coincide con una confianza estadística establecida. Habitualmente se realizan por lo menos 10 medidas en cada muestra.
- La cantidad de muestra sometida a prueba depende en general del número de medidas, el tamaño del haz y la densidad de embalaje de la muestra en el soporte de muestra, por ejemplo un tubo capilar o simplemente un soporte de comprimido.
- En el caso de muestras contenidas en un capilar, éste se mantiene en rotación durante la exposición a rayos X, habitualmente a lo largo de su eje principal, tal como se muestra en la figura 1 y se describe en la etapa (F). En tal caso, las mediciones, descritas en la etapa (G), tienen lugar a lo largo de la longitud del eje. Inversamente, en el caso de formulaciones o comprimidos, como la extensión espacial de la muestra produciría un ensanchamiento de los picos de difracción, y entonces un empeoramiento de la calidad del patrón final, la medición se realiza donde el espesor de la muestra es más pequeño. En el caso de comprimidos de sección circular la medición se realiza por tanto normalmente en la proximidad de la circunferencia máxima, tal como se muestra en la figura 2, asegurando, sin embargo, muestrear también la parte interior del comprimido, para una comparación de los datos.
- La etapa (H) del procedimiento comprende procesar los datos de la radiación recogidos por el detector para generar por lo menos una gráfica de intensidad frente a ángulo de dispersión.
- Las imágenes que representan la intensidad de los rayos X difractados desde la muestra pueden aparecer de diferentes maneras en función del grado de cristalinidad de la muestra y su poder de difracción. Cuando la muestra es un polvo cristalino o un polvo cristalino mezclado con un material amorfo, el aspecto de la imagen es generalmente el de un conjunto de anillos concéntricos más o menos uniformes, en función del tamaño de los cristales individuales que forman el polvo. El perfil radial muestra picos superpuestos en un fondo de diferente conformación, debido al componente amorfo de la muestra, que no produce picos de difracción, y debido a la interacción de los rayos X con el soporte de muestra (por ejemplo el capilar) y las moléculas presentes en el aire entre la muestra y el detector.
- La simetría del patrón de difracción permite una integración circular de los picos, con el siguiente resultado:
- mejora de relación señal/ruido para cada pico;
 - eliminación/reducción de falta de homogeneidad a lo largo de cada circunferencia debido a orientaciones preferidas de cristales individuales.
- La integración anterior se realiza utilizando programas adecuados (por ejemplo Fit2d, AreaDiffractionMachine) cuyos parámetros clave son distancia, longitud de onda, posición y orientación (angular) del detector en comparación con la muestra y el haz de rayos X entrante, tal como se obtienen de mediciones preliminares en muestras de referencia.
- El resultado de la integración es por tanto una función que dibuja una distancia radial desde el centro de simetría de las imágenes iniciales (expresada como un ángulo 2θ) frente a la altura de la señal, en particular la intensidad.
- Para facilitar una comparación de datos con los obtenidos con fuentes convencionales, también se escala de nuevo el eje horizontal en la posición de picos angulares debido a las diferentes longitudes de onda utilizadas (λ) según la ley de Bragg.
- En la presente descripción las expresiones "gráfica de intensidad frente a ángulo de dispersión" y "patrón de difracción integrado" se utilizan de manera intercambiable.
- La información contenida en el patrón de difracción integrado se realiza teniendo en cuenta la contribución del aire y la contribución del soporte de muestra (por ejemplo capilar). Esto se logra adquiriendo una o más imágenes de un capilar vacío mientras se mantienen invariables los parámetros restantes. Es por tanto posible obtener imágenes que van a integrarse como anteriormente, y que van a sustraerse de las imágenes anteriores, de modo que éstas últimas son representativas de la muestra solamente, en particular de su componente cristalino (que produce picos) y de su componente amorfo (que produce una línea de fondo).
- También puede obtenerse una línea de fondo utilizando procesos matemáticos o empíricos.
- Pueden realizarse la calidad de los datos obtenidos para los picos de difracción (por ejemplo sus posiciones y su

intensidad) realizando varias mediciones, tal como se mencionó anteriormente, obteniendo así varios patrones de difracción. La calidad de los datos se evalúa entonces realizando, tras la integración y sustracción del fondo, una comparación de cada patrón con los otros. Se realiza una cuantificación del grado de repetibilidad, en particular de la consistencia, de las mediciones calculando el grado de correlación (cc) entre cada par de patrones. Se utiliza la siguiente relación, en la que x e y representan cada par de patrones de difracción:

$$cc_{xy} = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \cdot \sum y^2}}$$

La relación anterior proporciona, para cada par de patrones, un valor de grado de correlación comprendido entre 0 (mediciones completamente no relacionadas) y 1 (mediciones perfectamente repetibles). Debido al gran número de coeficientes que van a evaluarse, se utiliza una representación gráfica de tales coeficientes. En tal representación se asocia un color (por ejemplo gris) a cada valor de cc_{xy} , utilizando diferentes tonos de color para distinguir entre diferentes valores de cc_{xy} . Los valores de la correlación se colocan entonces en una matriz cuyas entradas son los patrones en investigación. En las matrices (cajas grises) el valor de consistencia y representadas por una escala de grises: el color blanco representa la correlación más alta, en particular $cc_{xy} = 1$; un color negro representa un mínimo de consistencia, generalmente 0,5 (figura 3A), 0,9 (figura 3B) o 0,95 (figura 3C).

Las matrices se utilizan para revelar posibles faltas de homogeneidad en la distribución espacial de las diferentes formas polimórficas en la muestra, posibles faltas de homogeneidad del embalaje de la muestra, señalar fallos técnicos durante la recogida de datos y diferentes grados de cristalinidad de los polimorfos en la muestra.

Esta información puede conducir a la exclusión de algunos datos del conjunto de datos, excluir toda la muestra porque no es representativa o por otro lado confirmar la calidad de los datos recogidos. Las matrices pueden utilizarse en los datos en relación con el componente cristalino de la muestra así como su componente amorfo así como ambos, dando información similar y complementaria sobre la homogeneidad de la muestra y su representatividad estadística.

La etapa (I) del procedimiento comprende examinar la gráfica obtenida en la etapa (H) para detectar uno o más picos de marcadores de la forma polimórfica no predominante del compuesto polimórfico que va a investigarse en ángulos de dispersión en los que una o más formas polimórficas predominantes no exhiban picos de difracción.

Tras comprobar la buena consistencia de los datos (etapa H), es posible examinar y comparar las posiciones de los picos de difracción con las posiciones de picos obtenidas de compuestos de referencia o de la bibliografía o bases de datos de referencia disponibles. Tal comparación se lleva a cabo por tanto basándose en patrones de rayos X de referencia del compuesto polimórfico predominante y basándose en patrones de rayos X de referencia del compuesto polimórfico no predominante que va a detectarse.

Como el compuesto polimórfico predominante puede presentar picos en ángulos de dispersión en los que el compuesto polimórfico no predominante presenta picos que podrían solaparse con, y enmascarse por, el compuesto polimórfico predominante, el examen y comparación se realiza en ángulos de dispersión en los que el compuesto polimórfico predominante no presenta picos de difracción pero el compuesto polimórfico no predominante sí presenta picos de difracción.

Mediante esta comparación los picos que caracterizan la forma polimórfica no predominante del compuesto en investigación se detectan o, con un nivel de confianza dado, se confirma su ausencia. La sensibilidad más alta (límite de detección) garantizada por la radiación de sincrotrón hace posible detectar picos de marcadores de muy pequeñas cantidades de uno o más polimorfos del compuesto en investigación, que no sería posible utilizando una fuente de rayos X convencional.

La etapa (J) del procedimiento es opcional y se refiere a la determinación cuantitativa de la(s) forma(s) polimórfica(s) no predominante(s) del compuesto contenido en la muestra.

Una vez se detectan uno o más picos que caracterizan una forma polimórfica, es posible una determinación cuantitativa del contenido de esa forma polimórfica en la muestra. El procedimiento comprende utilizar la señal de un pico de marcador en por lo menos dos muestras con un contenido conocido de polimorfos, calculada como áreas de los picos de marcadores una vez normalizados al pico más fuerte a la forma polimórfica predominante. Como etapa siguiente se define una curva de calibración mediante la utilización de las señales que corresponden a las cantidades conocidas de polimorfo, entonces esta curva de calibración se utiliza para determinar el contenido de polimorfo de las muestras en investigación. Un error experimental está asociado a tal curva de calibración empezando desde el error asociado al contenido polimórfico de las muestra conocidas.

El análisis del patrón de difracción de rayos X según el procedimiento de la presente invención permite identificar los componentes cristalino y amorfo de la muestra. Más particularmente permite:

- estimar la relación cuantitativa entre los dos componentes comparando las áreas bajo los picos de difracción

con el área bajo el fondo;

- analizar el componente cristalino y detectar la posición e intensidades relativas de los picos de difracción, incluyendo detectar picos de marcadores de diferentes polimorfos presentes en la muestra.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran el procedimiento de la invención.

Ejemplo 1

10

El clopidogrel bisulfato es un agente antiplaquetario, de clase tienopiridina, oral, utilizado para inhibir coágulos sanguíneos en la enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebrovascular. El clopidogrel bisulfato presenta un polimorfo predominante designado como Forma 1 y un polimorfo no predominante designado como Forma 2.

15

Se utilizó una línea de luz de aparato de sincrotrón ubicado en Trieste, Italia. El sistema analítico tenía los siguientes parámetros optimizados:

20

- longitud de onda de rayos X: 1,0 Å;
- distancia muestra-detector: 400 mm;
- tamaño de foco de rayos X en muestra: 200 μm x 200 μm;
- detector: Pilatus (Dectris) 2M (254 x 289 mm², 0,172x0,172 mm² tamaño de píxel).
- Soporte de muestra capilar rotatorio, 30 muestras por capilar, 2 capilares.
- Velocidad de rotación de muestra 1,2 grados/seg, 300 segundos por exposición
- los datos se integraron utilizando fit2D;
- no se detectó ninguna evidencia de daño de radiación significativo utilizando los parámetros anteriores, tal como se muestra por las cajas grises indicadas en la figura 4.

25

30

35

Para el análisis por la técnica de rayos X convencional, se utilizó un instrumento Bruker D8 Advance dotado de geometría Bragg-Brentano. Las condiciones de trabajo eran:

40

- tubo de rayos X: cobre;
- radiación K(α1) y K(α2), 1,54060 Å e 1,54439 Å;
- tensión y corriente del generador: 35 kV, 50 mA;
- detector LynxEye PSD, ventana PSD 0,8°;
- tamaño de etapa: 0,016°;
- tiempo por etapa: 0,5s;
- intervalo de 2θ: 3-40°;
- soporte de muestra con rotación.

45

50

Los patrones de difracción integrados de compuestos de referencia se muestran en la figura 5. Los difractogramas se obtuvieron por la técnica convencional con ánodo de cobre.

La consistencia de los datos obtenidos utilizando radiación de sincrotrón se señalan mediante las cajas grises de las figuras 6A, 6B y 6C.

55

La figura 7a muestra el difractograma de una muestra de una mezcla que contiene clopidogrel bisulfato Forma 1 probablemente contaminada por clopidogrel bisulfato Forma 2, obtenido con luz de sincrotrón a 1,0 Å. La figura 7b muestra un zoom de una parte de la figura 7a anterior con señales típicas de la Forma 2. En la figura 8a se muestra la comparación entre la misma muestra que la anteriormente analizada con luz de sincrotrón y con la técnica convencional. Con la técnica convencional no fue posible ver trazas de la Forma 2, que estaban por debajo del límite de detección, véase la figura 8b.

60

Las muestras de las pruebas iniciales mostraron que la utilización de radiación de sincrotrón hace que la técnica sea mucho más sensible que con la fuente de rayos X convencional, permitiendo la detección de impurezas en muy bajo porcentaje, que no se detectó a través de fuentes convencionales.

65

Ejemplo 2

La retigabina es un anticonvulsivo utilizado en el tratamiento de epilepsias parciales. La retigabina presenta un polimorfo predominante designado como Forma C y un polimorfo no predominante designado como Forma A.

5 Se utilizó una línea de luz de aparato de sincrotrón ubicado en Trieste, Italia. El sistema analítico fue el mismo que en el ejemplo 1.

10 Para el análisis por la técnica de rayos X convencional, se utilizó un instrumento Bruker D8 Advance dotado de geometría Bragg-Brentano. Las condiciones de trabajo eran:

- tubo de rayos X: cobre;
- radiación K(α 1) y K(α 2), 1,54060 Å e 1,54439 Å;
- tensión y corriente del generador: 35 kV, 50 mA;
- 15 • detector LynxEye PSD, ventana PSD 0,8°;
- tamaño de etapa: 0,010°;
- tiempo por etapa: 2s;
- intervalo de 2θ : 3-40°;
- soporte de muestra con rotación.

20 En la figura 9 se muestran los patrones de difracción integrados de compuestos de referencia. Los difractogramas se obtuvieron por la técnica convencional con ánodo de cobre (1,54 Å).

25 La consistencia de los datos obtenidos utilizando radiación de sincrotrón se resaltan mediante las cajas grises de las figura 10A, 10B y 10C, mostrando algún grado de falta de homogeneidad en la muestra

En la figura 11a se indica una muestra de una mezcla que contiene Retigabina Forma C probablemente contaminada por retigabina Forma A analizada con luz de sincrotrón a 1,0 Å, y en la figura 11b se muestra un zoom de la figura 11a anterior con señales típicas de la Forma A. En la figura 12a se muestra la comparación a 1,0 Å entre la misma muestra que la anterior analizada con luz de sincrotrón y con la técnica convencional. Con la técnica convencional no fue posible ver trazas de Forma A, que estaban por debajo del límite de detección, véase la figura 12.b.

35 En la figura 13 se muestra el daño de radiación provocado por 30 exposiciones consecutivas de 300s cada una, realizadas en el mismo volumen de muestra. Debido al daño de radiación, el difractograma muestra algunos desplazamientos de pico, (por ejemplo a 14,1°), y a algunos cambios en intensidades relativas de picos. Para evitar daños en muestras de Retigabina, el tiempo de exposición se limitó a 180 segundos para cada medición.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la presencia y/o determinar la cantidad de una forma polimórfica no predominante de un compuesto polimórfico en presencia de una o más formas polimórficas predominantes, que comprende las etapas siguientes:
- (A) proporcionar una muestra que comprende dicho compuesto polimórfico en forma de polvo o en una forma sólida conformada o en una forma en la que el compuesto polimórfico sólido está en suspensión, dispersado o mezclado con un líquido;
- (B) proporcionar una información de referencia a partir del análisis de XRD sobre la posición de los picos de marcadores de dicha forma polimórfica no predominante de dicho compuesto en una gráfica estándar de intensidad frente a ángulo de dispersión en relación con los picos de dichas una o más formas polimórficas predominantes;
- (C) proporcionar un haz de una radiación de sincrotrón a partir de una fuente de sincrotrón, presentando dicha radiación de sincrotrón una longitud de onda en el intervalo desde 0,5 a 3,0 Å.
- (D) exponer dicha muestra a dicho haz con un tamaño de punto en dicha muestra desde $100\ \mu\text{m}^2$ a $0,1\ \text{cm}^2$, seleccionándose dicho tamaño de punto utilizando hendiduras o poros;
- (E) comprobar la extensión del posible daño provocado por la exposición de la muestra a la radiación de sincrotrón;
- (F) recoger la intensidad y dirección de dispersión de la radiación difractada utilizando un detector de rayos X, mientras se hace girar opcionalmente dicha muestra para explorar diferentes orientaciones del volumen de muestra alcanzado por el haz;
- (G) mover una o más veces dicha muestra con respecto a dicho haz para exponer unas zonas diferentes de dicha muestra a dicho haz y equilibrar posibles faltas de homogeneidad de la muestra, y repetir la etapa (F) para las zonas diferentes de la muestra;
- (H) tratar los datos de intensidad y dirección de dispersión de dicha radiación recogida por dicho detector para generar por lo menos una gráfica que informa de la intensidad de rayos X dispersados frente a ángulo de dispersión;
- (I) examinar dicha gráfica para detectar uno o más picos de marcadores de dicha forma polimórfica no predominante de dicho compuesto en unos ángulos de dispersión en los que dichas una o más formas polimórficas predominantes no presentan picos de difracción;
- (J) tratar opcionalmente los datos que corresponden a dichos uno o más picos de marcadores para cuantificar dicha forma polimórfica no predominante de dicho compuesto con respecto a la forma predominante.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha radiación de sincrotrón presenta una longitud de onda en el intervalo desde 0,8 a 1,5 Å.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que dicha radiación de sincrotrón presenta un tamaño de punto en la muestra desde 200 hasta 300 μm .
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha muestra está en forma de polvo o en una forma en la que el compuesto polimórfico sólido está suspendido, dispersado o mezclado con un líquido y está contenido en un tubo capilar soportado por un soporte para muestras que se hace girar alrededor del eje longitudinal de dicho tubo capilar, para exponer unas zonas diferentes de dicha muestra a dicha radiación, equilibrándose así la posible falta de homogeneidad de dicha muestra.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha muestra está en forma de un comprimido y dichas zonas diferentes de la muestra que están expuestas a dicho haz de radiación de sincrotrón según la etapa (G) corresponden a unas partes de dicha muestra en las que el espesor de la muestra es más pequeño que el espesor en algunas otras zonas de dicha muestra.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha etapa (H) comprende:
- a. generar una pluralidad de gráficas de intensidad frente a ángulo de dispersión;
- b. realizar una comparación de cada gráfica con las otras;

- c. cuantificar el grado de repetitividad de las mediciones calculando un grado de correlación (cc) entre cada par de gráficas según la relación siguiente

$$cc_{xy} = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \cdot \sum y^2}}$$

5 en la que x e y representan cada par de gráficas; proporcionando dicha relación para cada par de patrones un valor de grado de correlación comprendido entre 0 y 1.

10 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que dicha etapa (I) comprende examinar dichas gráficas que presentan un grado de correlación comprendido entre 0 y 1.

15 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha etapa (J) comprende utilizar la señal de un pico de marcador en por lo menos dos muestras con una relación conocida de contenido de polimorfos, calculado como áreas de los picos de marcadores, y definir una línea de calibración relacionada para determinar el contenido de polimorfo de una muestra con un contenido desconocido de dicho polimorfo.

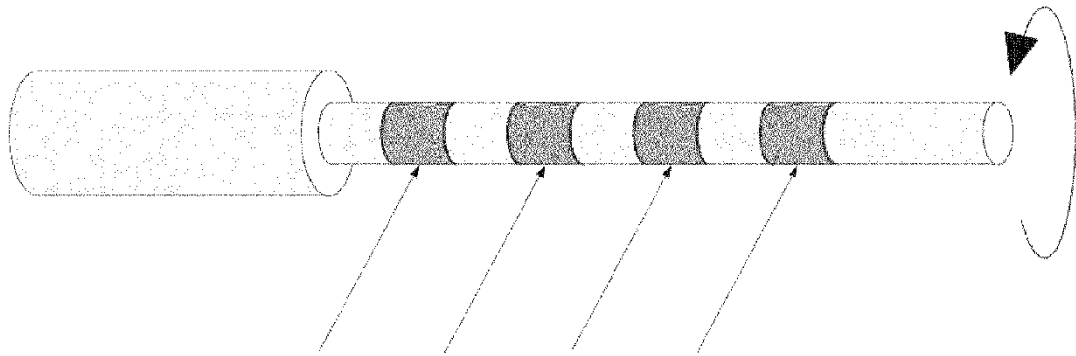


Fig. 1

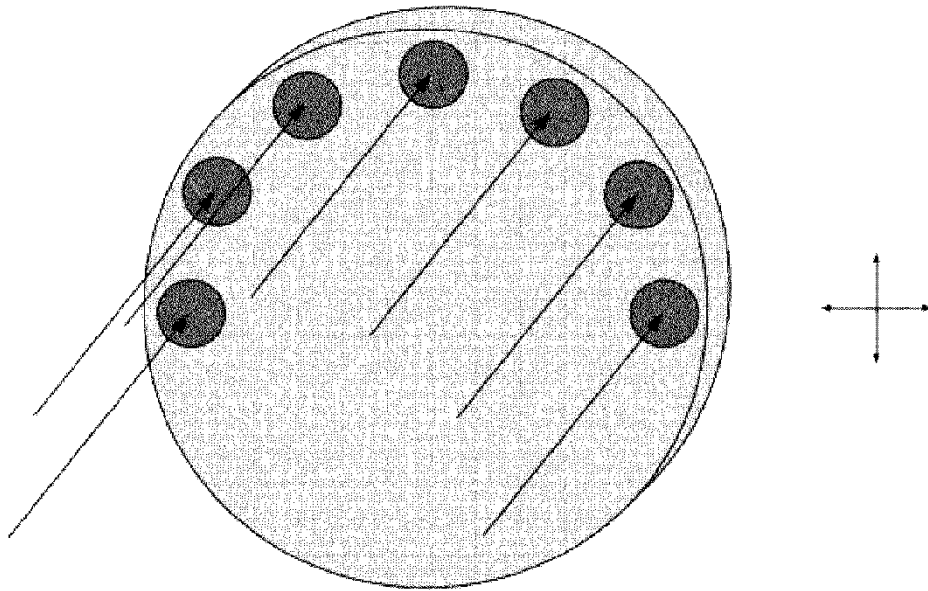


Fig. 2

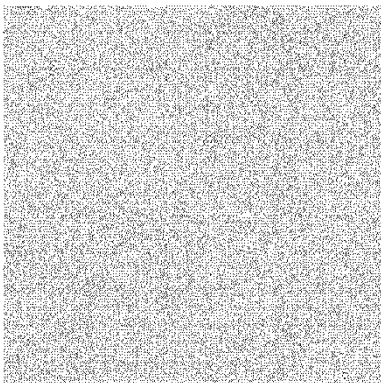


Fig. 3A

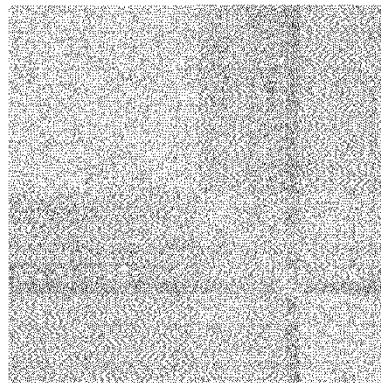


Fig. 3B

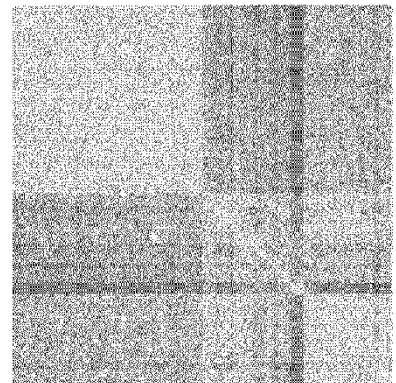


Fig. 3C

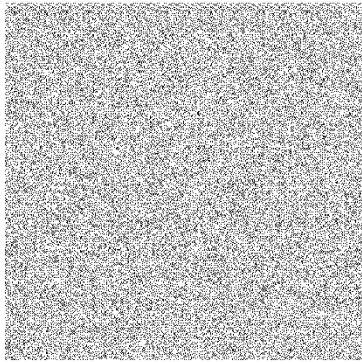


Fig. 4A

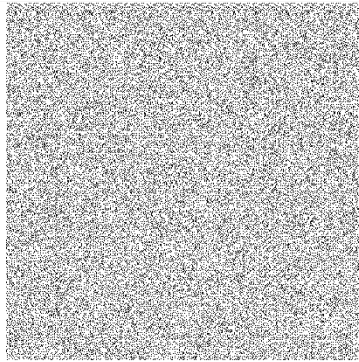


Fig. 4B

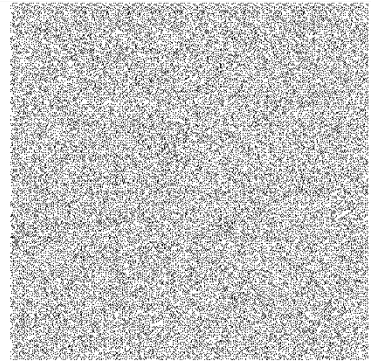


Fig. 4C

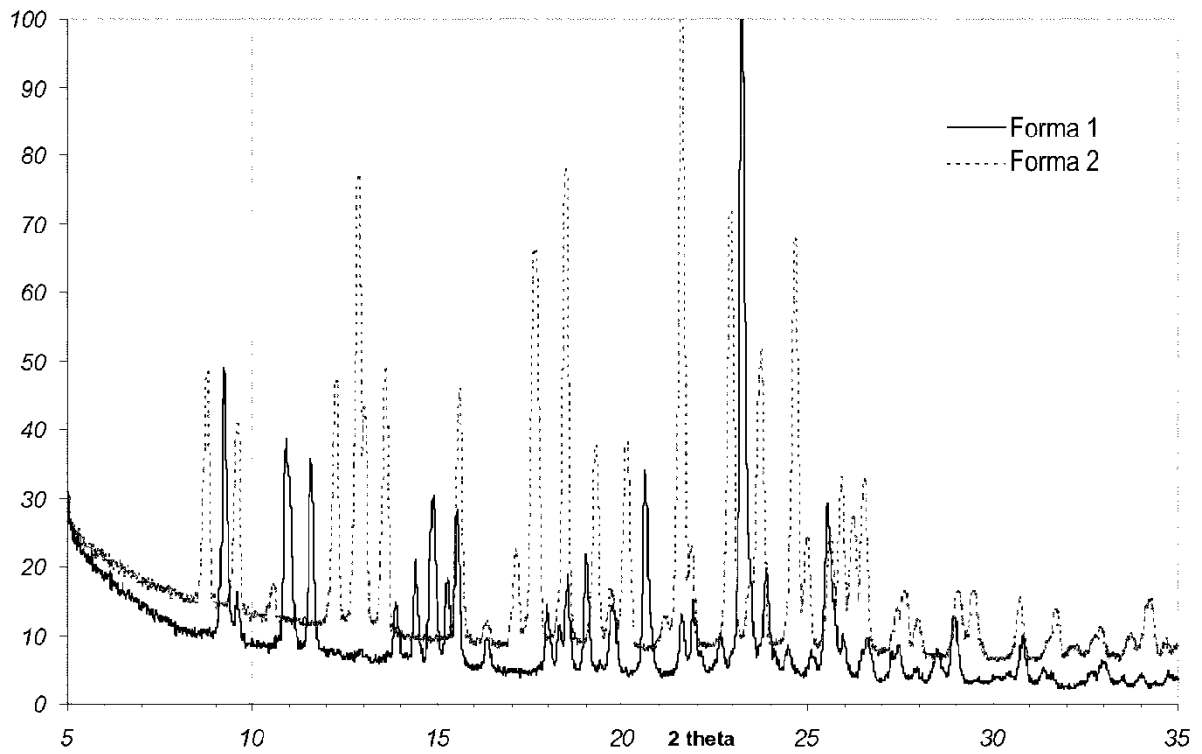


Fig. 5 (1.54Å)

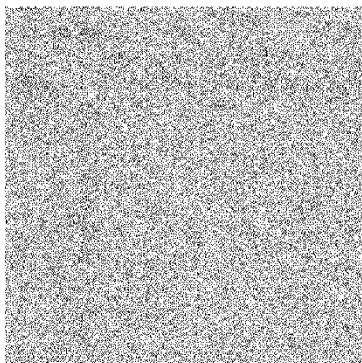


Fig. 6A

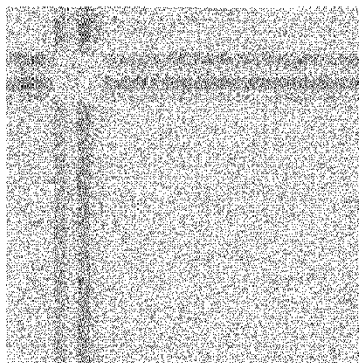


Fig. 6B

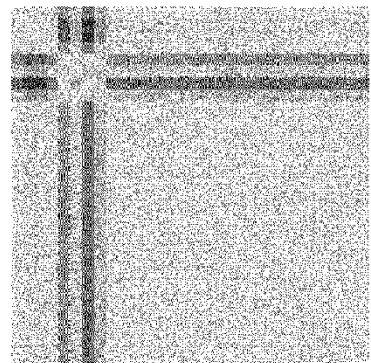


Fig. 6C

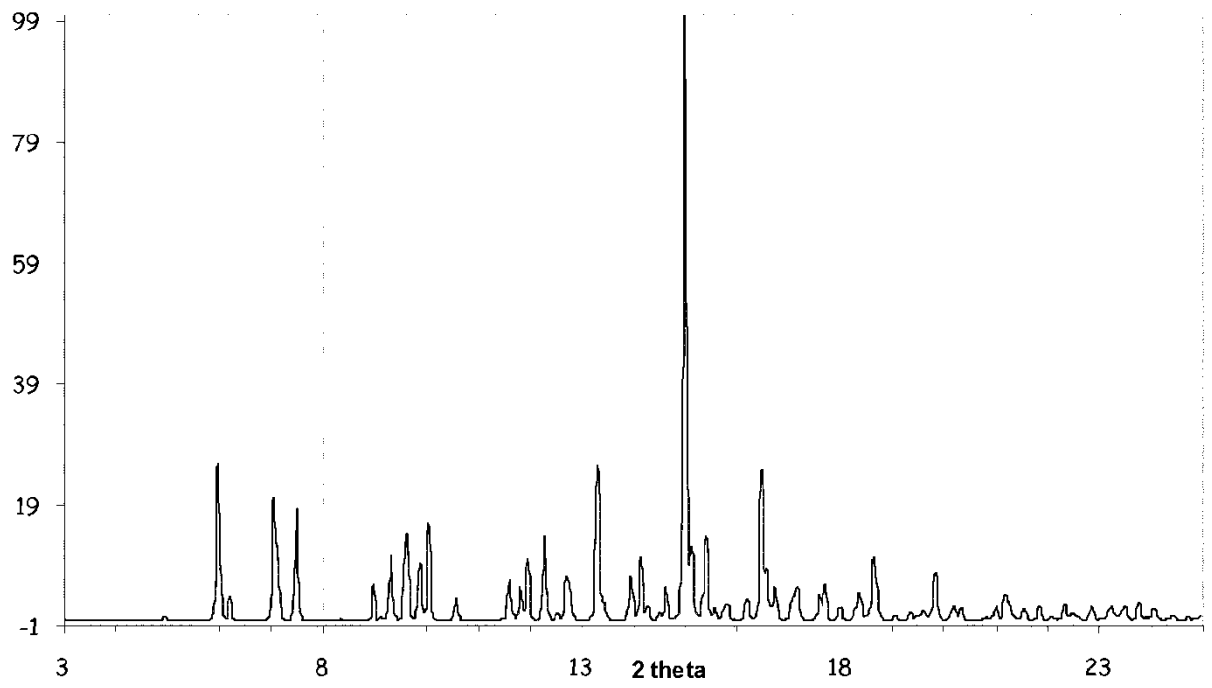


Fig. 7.a (1.0Å)

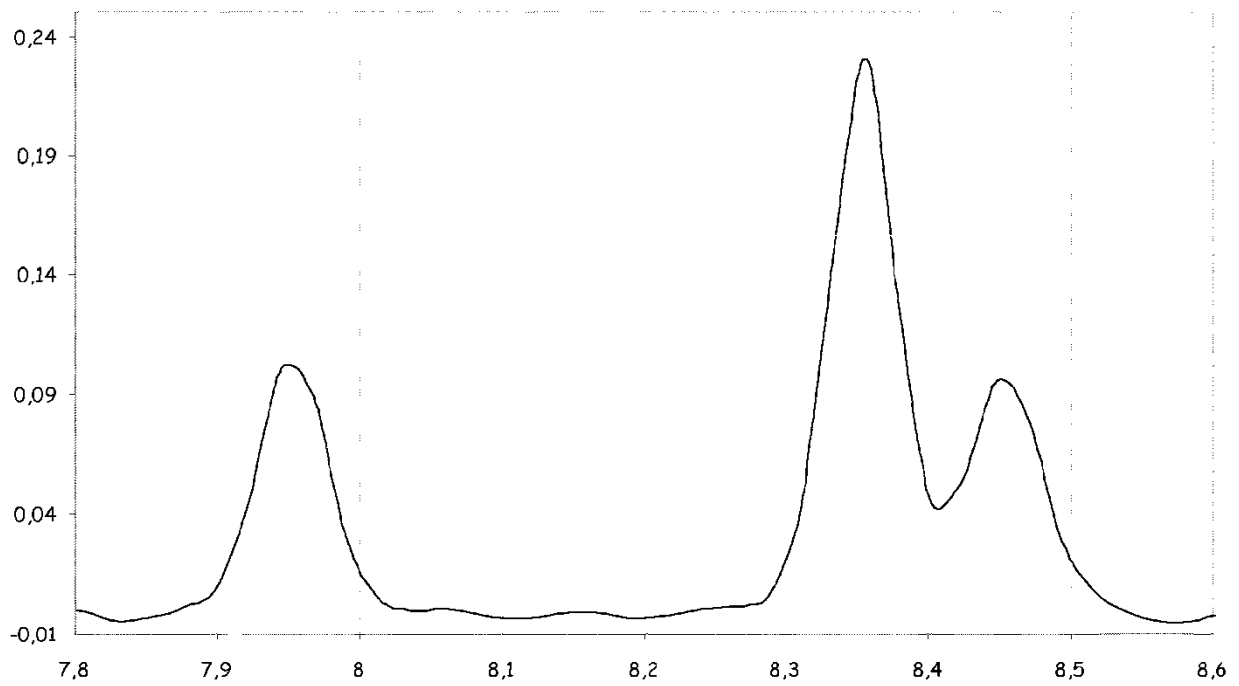


Fig. 7.b (zoom)

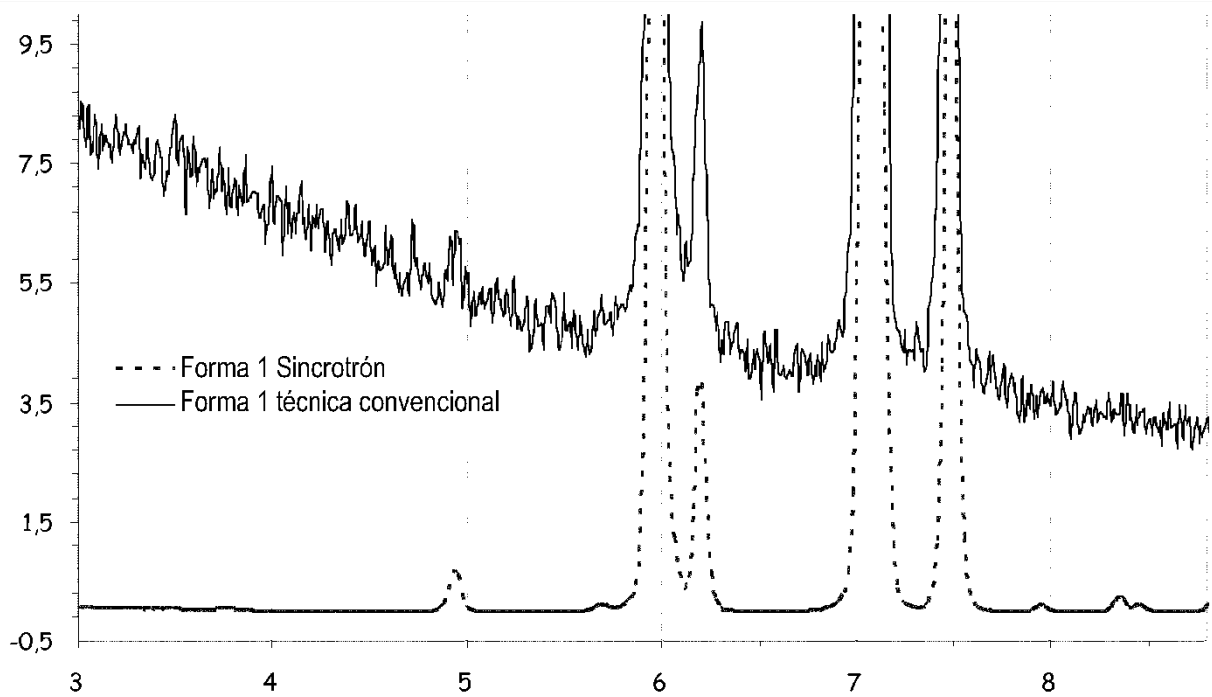


Fig. 8.a (1.0Å)

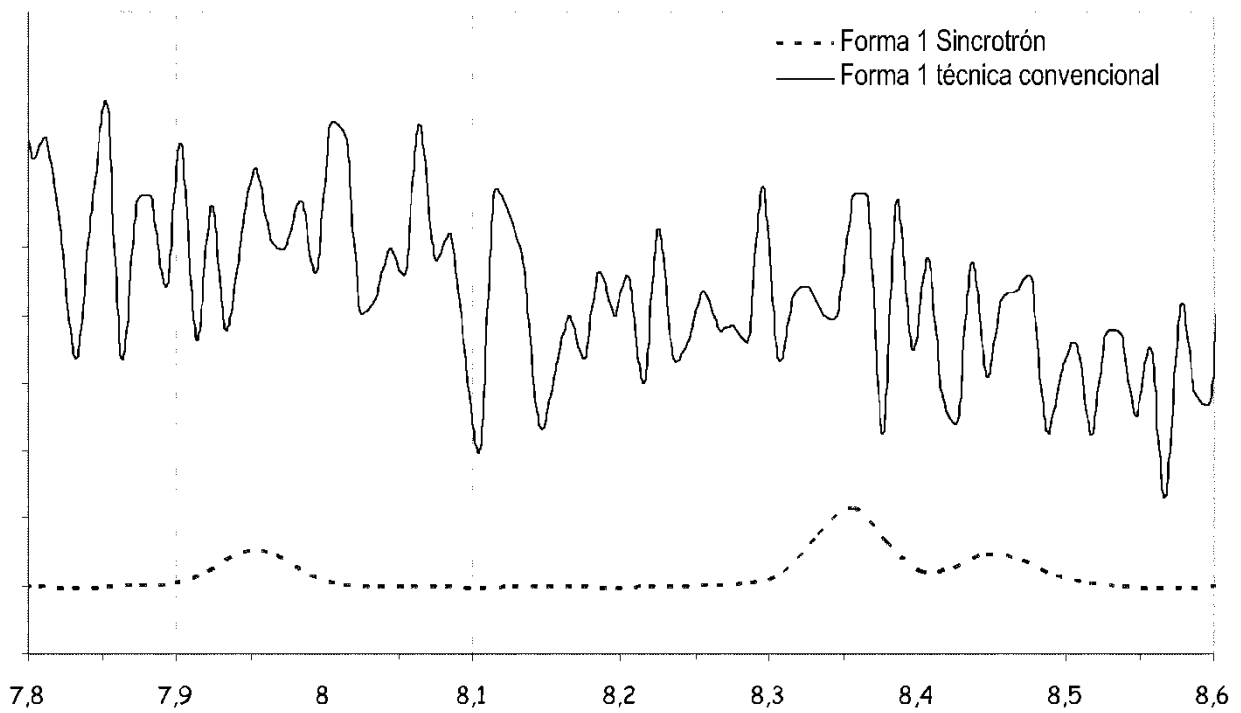


Fig. 8.b (zoom) (1.0Å)

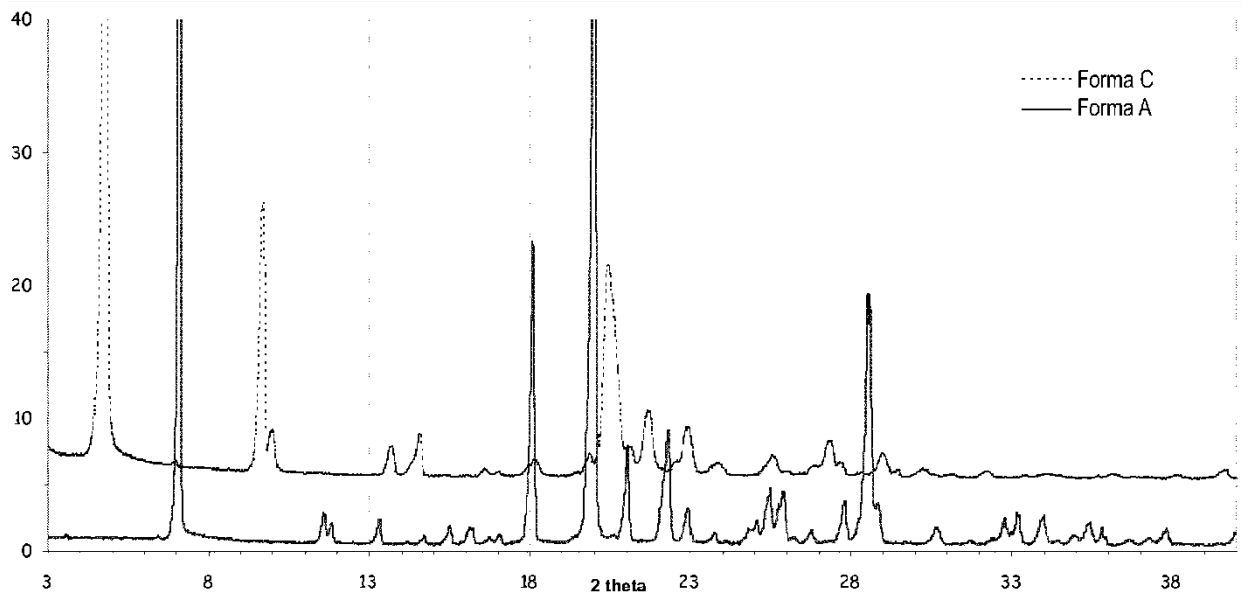


Fig. 9 (1.54Å)

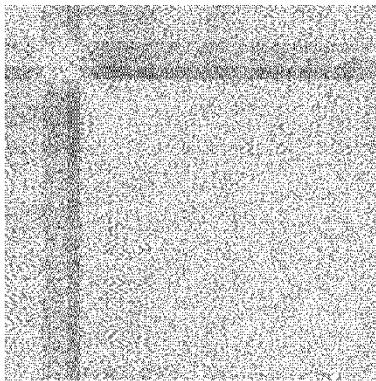


Fig. 10A

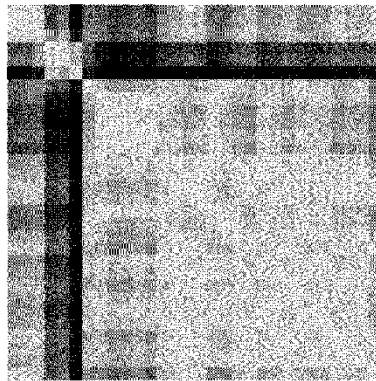


Fig. 10B

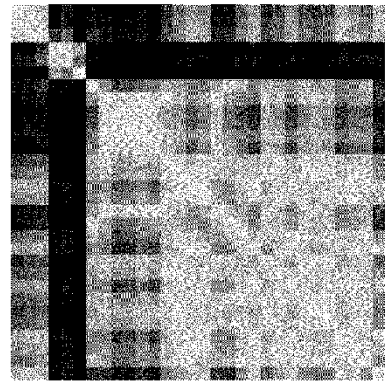


Fig. 10C

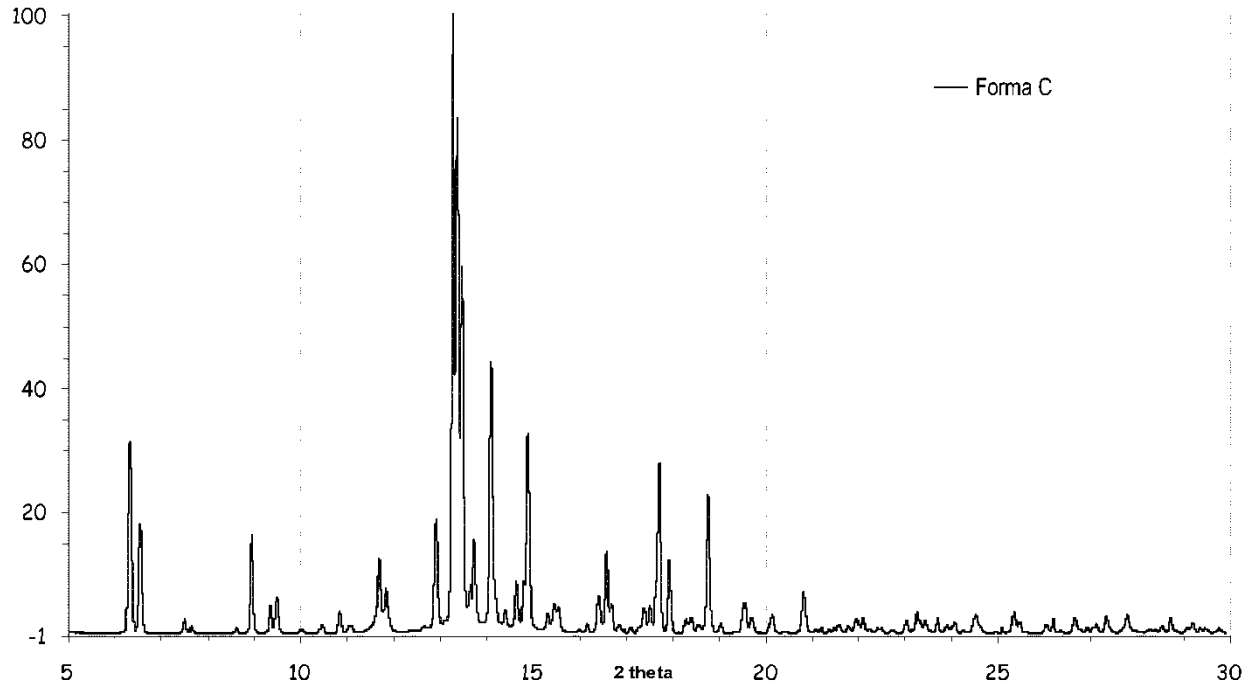


Fig. 11.a (1.0Å)

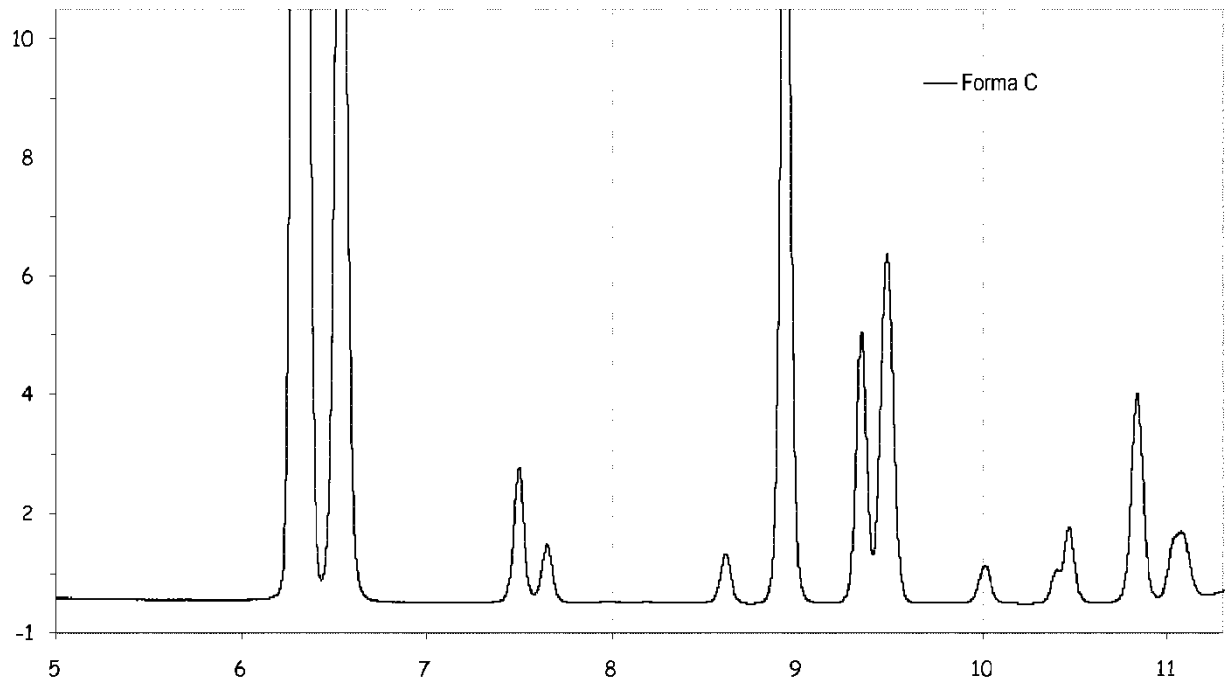
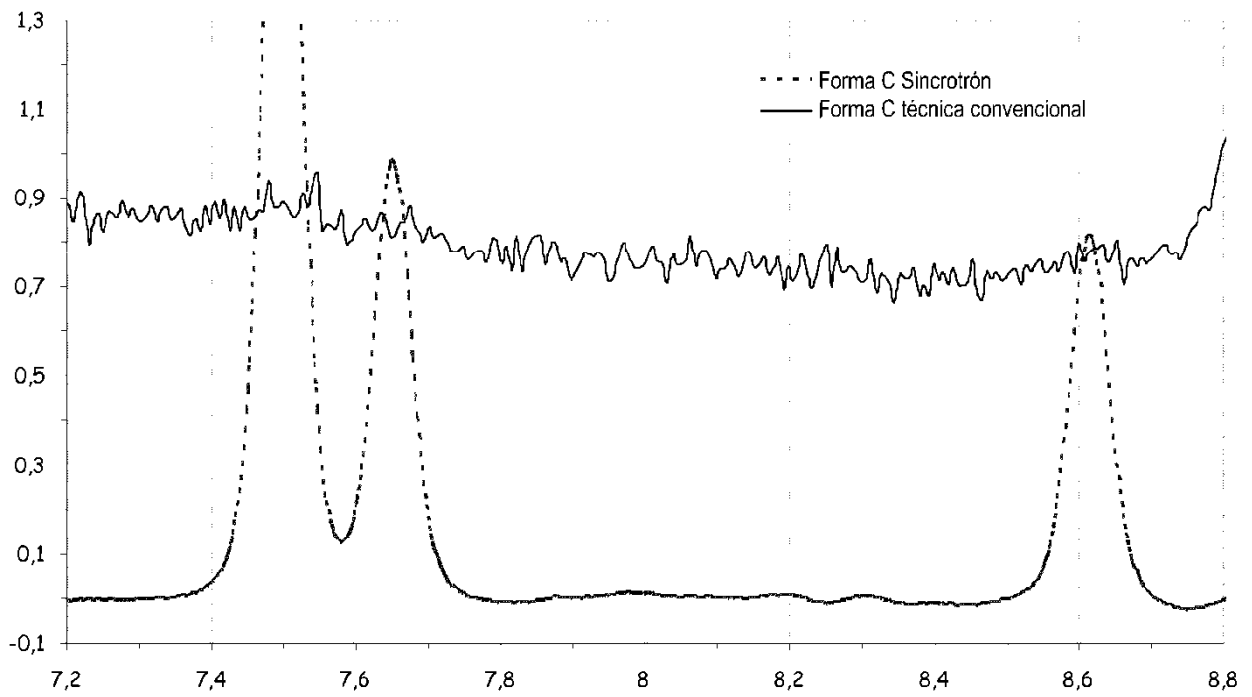
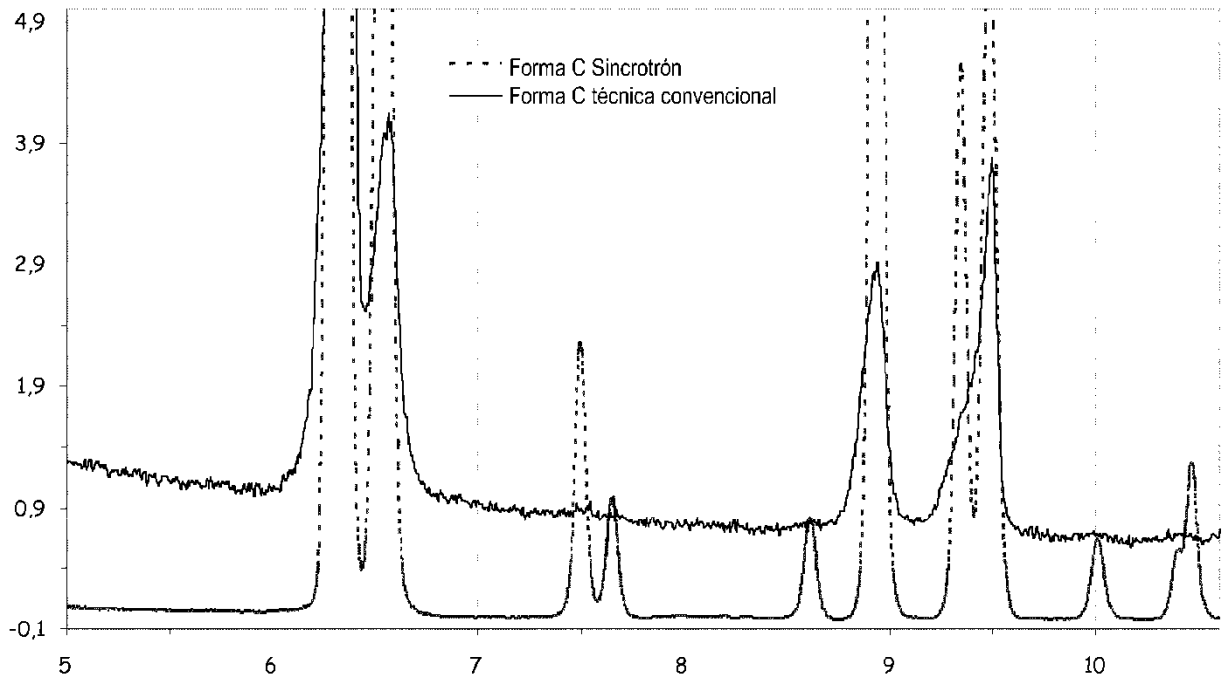


Fig. 11.b (zoom)



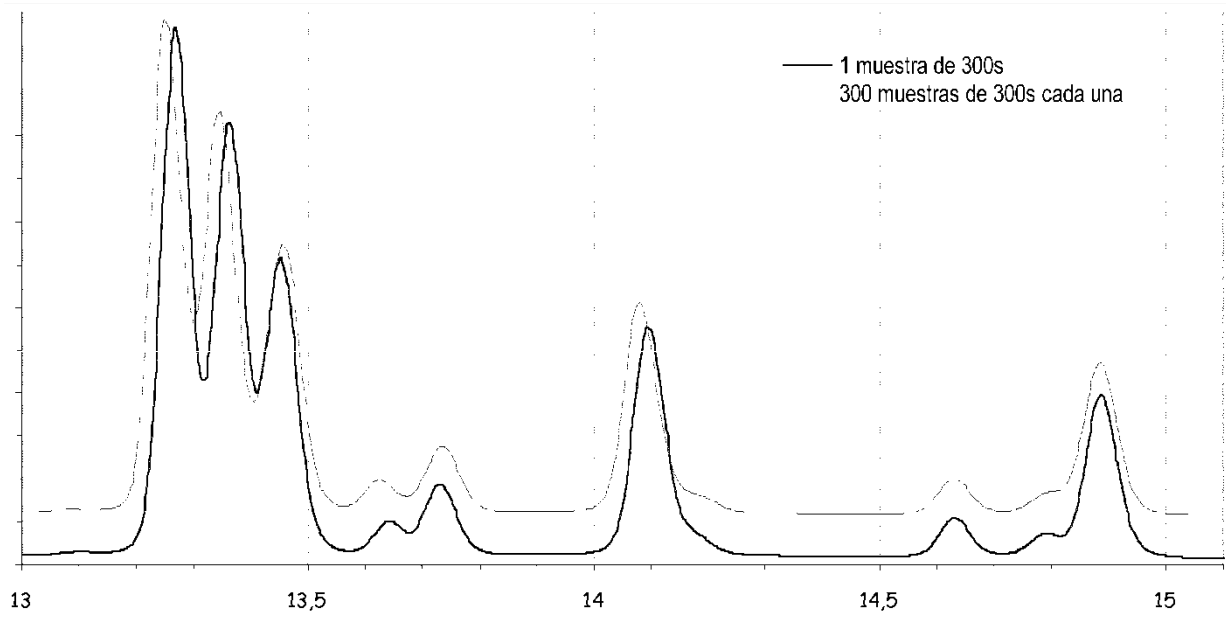


Fig. 13