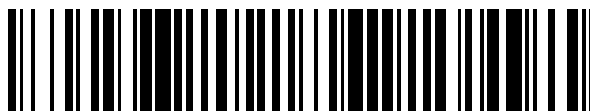


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 358**

51 Int. Cl.:

**C07C 235/06** (2006.01)

**A61K 31/165** (2006.01)

**A61P 25/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2008 PCT/EP2008/065367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09062949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08849561 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2220027**

54 Título: **Forma polimórfica de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida**

30 Prioridad:

**13.11.2007 EP 07120551**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2017**

73 Titular/es:

**LABORATORIO FARMACEUTICO C.T. S.R.L.  
(100.0%)  
STRADA SOLARO, 97  
18038 SANREMO (IMPERIA), IT**

72 Inventor/es:

**CACCIAGLIA, ROBERTO y  
FERRARI, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

**RUO , Alessandro**

**Observaciones:**

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

ES 2 602 358 T3

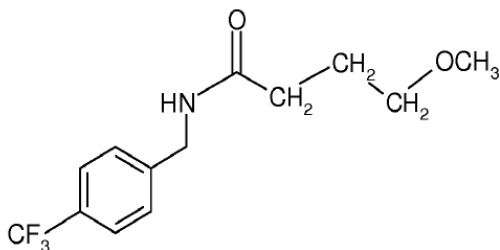
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Forma polimórfica de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a una nueva forma polimórfica de un compuesto de Fórmula (I)



(I)

10 concretamente N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida, y su uso en el tratamiento de la drogadicción y, en particular, en el tratamiento del alcoholismo.

**Estado de la técnica**

15 **[0002]** N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida se ha divulgado por vez primera en la patente Europea EP 0 932 597 B1 como parte de un grupo de amidas útiles en el tratamiento de la drogadicción y en el alcoholismo.

20 **[0003]** De acuerdo con dicha patente, N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida, que posee un residuo 4-trifluorometilbencil exhibió propiedades óptimas en términos de actividad neurofarmacológica, en comparación con sales de ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico (GHB), adecuadamente conocido en el tratamiento del alcoholismo. En particular, en la evaluación de los efectos en la actividad motora de la rata, se mostraron propiedades de potencia y duración de la acción, que eran mejores que GHB y aún mejores que otras amidas que poseen residuos diferentes en la estructura.

25 **[0004]** En vista de su actividad neurofarmacológica óptima, se solicitó, por lo tanto, N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida con elevada pureza y elevado rendimiento a fin de utilizarse en farmacología.

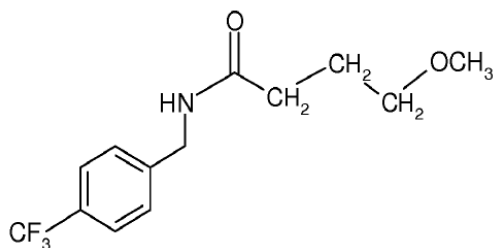
**[0005]** En primer lugar, los inventores de la presente invención han tratado de obtener N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida siguiendo la preparación descrita en la patente.

30 **[0006]** Específicamente, de acuerdo con el documento EP 0 932 597 B1, el compuesto se preparó siguiendo el método general de síntesis descrito en la página 8 de la patente, que proporcionó las siguientes etapas: A) reacción del éster del ácido 4-alkoxibutírico con una amina adecuada en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a una temperatura de 160-170 °C, obteniendo en consecuencia el producto crudo, B) cromatografía del crudo en gel de sílice al eluirse con ciclohexano/acetato de etilo, y por último C) cristalización de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ . No obstante, siguiendo este procedimiento, los presentes inventores hallaron que, aunque obtuviesen el compuesto deseado, este tendría cada vez diferentes características físico-químicas. El método general de síntesis indicado en el documento EP 0 932 597 B1 reveló por lo tanto poseer una escasa reproducibilidad y debido a la etapa B) de purificación también resulta muy costoso y por tanto no es adecuado para la preparación de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida a escala industrial.

40 **Sumario**

45 **[0007]** Al tratar de resolver el problema de la reproducibilidad del proceso de preparación de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida, los presentes inventores han hallado sorprendentemente que el compuesto puede encontrarse en diferentes formas polimórficas. En concreto, desarrollando la preparación y destilación, y analizando cada vez el producto obtenido, hallaron dos formas polimórficas innovadoras de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida, la forma A y la forma B, que poseen diferentes empaquetados cristalinos. La forma polimórfica A es únicamente el objeto de la presente solicitud.

50 **[0008]** Por lo tanto, la presente invención proporciona en un aspecto una forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida de fórmula:



(I)

que posee los siguientes picos en grados de difracción (2-theta) en el patrón de difracción de rayos X en polvo  $\pm 0,2$ :

9,7; 12,0; 18,0; 24,1; 25,9.

5

**[0009]** Además, los inventores hallaron asimismo un proceso capaz de producir la forma polimórfica A innovadora de manera que siempre sea reproducible, estable y posea una elevada pureza sin la necesidad de una etapa de purificación cromatográfica.

10 **[0010]** En un aspecto adicional, la presente invención se refiere por lo tanto a un proceso de preparación de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida que comprende las siguientes etapas:

i) reaccionar 4-trifluorometilbencilamina con 4-metoxibutirato de metilo en presencia de un catalizador para obtener así N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida en bruto; y

15 ii) obtener una forma polimórfica A cristalina a partir de una solución de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida en bruto en un disolvente orgánico, dicha solución se siembra con la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida, y en la que el disolvente orgánico se selecciona entre tolueno y una mezcla de acetato de etilo/n-hexano.

20 **[0011]** La forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida es útil en el tratamiento de la drogadicción y en el tratamiento del alcoholismo. Más particularmente, es útil en la reducción del consumo voluntario de alcohol etílico y en el tratamiento del síndrome de abstinencia. Es más, la forma polimórfica A anteriormente mencionada resulta útil igualmente en el tratamiento de las crisis de abstinencia a causa de drogas adictivas, tales como heroína, cocaína, morfina y drogas psicoactivas.

25

**[0012]** Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida para su uso como medicamento.

30 **[0013]** En otro aspecto, la presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende como agente activo una cantidad eficaz de una forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida y un transportador farmacéuticamente aceptable.

### Descripción de las figuras

35 **[0014]**

La Figura 1 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida en la forma polimórfica A cristalina;

40 La Figura 2 muestra el espectro infrarrojo de la forma polimórfica A cristalina de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida;

La Figura 3 muestra el espectro de calorimetría de barrido diferencial (CBD) de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida;

La Figura 4 muestra la relación entre el espectro IR de la forma polimórfica A y la forma polimórfica B de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida;

45 La Figura 5A muestra los resultados del modelo de una ingesta de alcohol espontánea en ratas sP sin privar tras la administración de la forma polimórfica A;

La Figura 5B muestra los resultados de un modelo del efecto de privación de alcohol en ratas sP sin privar tras la administración de elevadas dosis de la forma polimórfica A; y

50 La Figura 5C muestra los resultados de un modelo del efecto de privación de alcohol en ratas sP sin privar tras la administración de pequeñas dosis de la forma polimórfica A.

### Descripción detallada de la invención

55 **[0015]** La invención se refiere a una nueva forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)benzil]-4-metoxibutiramida, que posee picos relevantes en los grados de difracción (2-theta en grado angular  $\pm 0,2^\circ$ ) en el patrón de difracción

de rayos X en polvo, específicamente 9,7, 12,0, 18,0, 24,1, 25,9 para la forma polimórfica A. Concretamente, la forma polimórfica A exhibe 18 picos en los grados de difracción con la intensidad mostrada a continuación en la Tabla 1 en el patrón de difracción de rayos X en polvo representado en la Fig. 1.

5

Tabla 1: Picos de la forma polimórfica A (2-theta en grado angular  $\pm 0,2^\circ$ )

Pico	2-theta	Intensidad (cps)	I/I <sub>0</sub>
1	6,0	4.082	40
2	9,7	797	8
3	11,0	640	7
4	12,0	8.297	80
5	17,6	2.032	20
6	18,0	2.173	21
7	18,7	2.658	26
8	18,9	3.293	32
9	19,6	919	9
10	20,7	7.158	69
11	21,6	2.730	27
12	22,2	2.601	26
13	23,4	3.261	32
14	24,1	10.380	100
15	24,7	1.663	17
16	25,9	5.534	54
17	26,2	1.771	18
18	28,2	1.889	19

**[0016]** Según la presente invención, la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida puede prepararse por el proceso que comprende las siguientes etapas:

- 10 i) reaccionar 4-trifluorometilencilamina con 4-metoxibutirato de metilo en presencia de un catalizador para obtener así N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto; y
- 15 ii) obtener una forma polimórfica A cristalina a partir de una solución de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto en un disolvente orgánico, dicha solución se siembra con la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida, y en la que el disolvente orgánico se selecciona entre tolueno y una mezcla de acetato de etilo/n-hexano.

4-trifluorometilencilamina de la etapa (i) puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos de síntesis de aminas aromáticas. Preferentemente, 4-trifluorometilencilamina se prepara al reaccionar 4-trifluorometilbenzaldehído con hidroxilamina de acuerdo con el siguiente esquema:

20



**[0028]** Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la forma polimórfica A y excipientes farmacéuticamente adecuados.

**[0029]** La composición de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente 12,5 a 50 % en peso de la forma polimórfica A.

**[0030]** Dichas composiciones pueden prepararse utilizando diluyentes o excipientes convencionales y técnicas conocidas en la materia galénica. Las composiciones farmacéuticas que comprenden la forma polimórfica A pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo oralmente o parenteralmente.

**[0031]** Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden encontrarse ventajosamente en forma sólida, tal como polvos, gránulos, comprimidos, pastillas opcionalmente efervescentes, comprimidas o recubiertas, grageas, bolsitas, cápsulas duras o blandas, o en forma líquida, tal como soluciones, suspensiones o emulsiones. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral pueden encontrarse en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas.

**[0032]** En composiciones sólidas, la forma A puede combinarse con cualquiera de los excipientes sólidos adecuados, por ejemplo, seleccionados entre agentes lubricantes, agentes disgregantes, materiales de relleno, etcétera.

**[0033]** En composiciones líquidas, la forma A puede, por ejemplo, disolverse en agua, en disolventes orgánicos o en alcoholes.

**[0034]** La forma polimórfica A puede utilizarse ventajosamente en el tratamiento de la drogadicción y en el tratamiento del alcoholismo.

**[0035]** Para estos objetivos, los polimorfos pueden administrarse preferentemente en dosis de 5 a 50 mg/kg.

**[0036]** Aunque los polimorfos poseen características similares y actividades similares a fin de utilizarse como medicamentos, de acuerdo con la presente invención, resulta preferente la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida. En realidad, dicha forma polimórfica A ha mostrado propiedades físicas óptimas, tales como compresibilidad y densidad, dando lugar de este modo a una mejor trabajabilidad y manipulación, que son extremadamente importantes en la formulación y fabricación del producto.

**[0037]** Además, y como resultará evidente a partir de la parte experimental, la forma polimórfica A ha mostrado sorprendentemente actividad terapéutica en la dependencia del alcohol, incluso en dosis farmacológicas muy pequeñas de 5 a 10 mg/kg.

**[0038]** La forma A también se ha ensayado para la farmacología de seguridad, la toxicología, y la genotoxicidad, y se consideró segura con perfiles muy bajos de toxicidad y genotoxicidad como se demuestra a continuación.

**[0039]** La invención se describirá con mayor detalle a modo de ejemplos no limitantes a fin de caracterizar mejor la forma A, sus características químico-físicas y farmacológicas.

#### EJEMPLO 1 - Preparación de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida.

##### A) Preparación de 4-trifluorometilbencilamina

**[0040]** En un reactor de 15 kg de agua destilada, se cargaron 2,50 kg de acetato de sodio, 2,30 kg de hidroxilamina clorhidrato, y 4,00 kg de metanol. A temperatura ambiente, se añadieron 5,0 kg de trifluorometilbenzaldehído y la mezcla se agitó en primer lugar durante aproximadamente treinta minutos y luego se destilaron al vacío 5 kg de disolvente. A continuación, se añadieron 12,0 kg de ácido acético al 80 % y después se añadieron 4,5 kg de cinc en porciones, dejando que la temperatura aumente hasta 60-80 °C por exoterma. A continuación, dicha temperatura se mantuvo por enfriamiento. Al final de la reacción, se añadieron 10,0 kg de tolueno y 15,0 kg de amoníaco al 30 % para eliminar las sales de cinc. La masa así obtenida se agitó a 50-60 °C y luego se desechó la fase acuosa inferior.

**[0041]** Después de la destilación al vacío hasta aproximadamente la mitad del volumen, la solución toluénica que contiene 4-trifluorometilbencilamina se recuperó y se utilizó en la etapa posterior (i).

**[0042]** Se obtuvieron 4,00 kg de 4-trifluorometilbencilamina conforme se determinó por el ajuste potenciométrico. Rendimiento: 79,5 %

B) etapa i) de la preparación de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto.

[0043] La solución toluénica obtenida en A) (4,00 kg de 4-trifluorometilencilamina) se cargó en un reactor. Después de la destilación hasta obtener un residuo de aceite, se añadieron 3,20 kg de 4-metoxibutirato de metilo, 0,40 kg de metilato de sodio al 30 %. La solución se calentó entonces a 110-120 °C, se destiló a presión atmosférica con el fin de eliminar todo el metanol (también el metanol se libera a partir de la reacción) y se mantuvo dicha temperatura durante al menos dos horas. El reactor a 110-120 °C se puso luego al vacío durante al menos una hora. Al final de la reacción, se añadieron a la masa 12,0 kg de tolueno, 2,0 kg de agua y 0,40 kg de ácido acético al 80 %. Tras la agitación, la fase acuosa inferior se separó y se eliminó. Después, la fase orgánica se destiló al vacío en un residuo de aceite. En dicho residuo, se añadieron 4,00 kg de acetato de etilo, 12,0 kg de n-hexano y la masa final se calentó a 40-60 °C hasta obtener una solución completa. A continuación, la solución se llevó a 20-30 °C y así se mantuvo hasta obtener una buena precipitación. La masa se enfrió a 0 °C-10 °C, se centrifugó por medio de un lavado con una mezcla de 0,80 kg de acetato de etilo, 4,00 kg de n-hexano. El producto húmedo obtenido se utilizó como tal en la etapa siguiente.

[0044] Se obtuvieron aproximadamente 3,8 kg de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto. Rendimiento: 60,5 %.

C) Etapa (ii) de cristalización de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida

[0045] Se cargaron en un reactor 3,8 kg de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto (el producto húmedo correspondiente), 3,8 kg de acetato de etilo y 11,4 kg de n-hexano. La masa se calentó a 40-60 °C hasta obtener una solución completa y después la solución se llevó a 25-35 °C. Se sembraron 0,038 kg de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida. La masa se mantuvo a 25-35 °C durante al menos una hora y después se enfrió a 10-20 °C y de nuevo se mantuvo durante al menos una hora. A continuación, la masa se centrifugó por medio de un lavado con una mezcla previamente preparada y que contenía 0,76 kg de acetato de etilo, 2,28 kg de n-hexano. El producto obtenido se secó a 40-50 °C. Se obtuvieron aproximadamente 3,4 kg de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida. Rendimiento: 89,5 %.

#### EJEMPLO 2: Análisis de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida

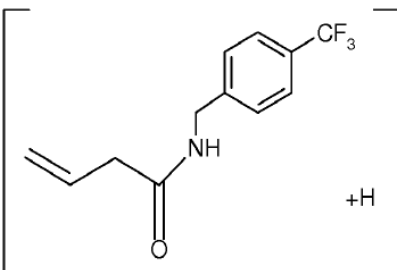
[0046] En primer lugar, el producto cristalizado del Ejemplo 1 se analizó con el fin de confirmar que era N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida.

[0047] Una muestra del Ejemplo 1 se sometió a:

- Análisis de masas a través de la técnica ESI(+)(ionización por electrospray) con un aparato Thermo-Finnigan LCQ-Advantage.

[0048] El peso molecular resultó ser 275, pese al patrón de fragmentación masa/masa, los resultados eran conformes la siguiente Tabla 3:

Tabla 3: Resultados del patrón de fragmentación masa/masa

m/z	Designación
276	[M+H] <sup>+</sup>
244	

[0049] El peso molecular y el patrón de fragmentación masa/masa confirmaron la estructura de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida.

- Análisis RMN <sup>1</sup>H a través del disolvente CDCl<sub>3</sub> y CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O con el aparato Varian Gemini 200 que funciona a 200 MHz.

[0050] El espectro RMN confirmó la estructura de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida de acuerdo con los siguientes resultados:

Tabla 4: Espectro RMN <sup>1</sup>H de N [4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida

δ (ppm)	multiplicidad	(H)	J(Hz)	Designación
1,91	d-triplete	(2)	6,2;7,3	CH <sub>2</sub>
2,33	triplete	(2)	7,3	CH <sub>2</sub>
3,28	singlete	(3)	-	CH <sub>3</sub>
3,40	triplete	(2)	6,2	CH <sub>2</sub>
4,46	doblete	(2)	5,9	CH <sub>2</sub>
6,31	singlete ancho	(1)	-	NH
7,37	Sistema AA'BB'	(2)	8,1	H;H
7,56	Sistema AA'BB'	(2)	8,1	H;H

- Análisis elemental

5 **[0051]** La muestra dio los siguientes valores elementales, que correspondían a los calculados:

Tabla 5: Valores elementales para C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub> F <sub>3</sub>		
(%) calculado para C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	(%) encontrado	
C	56,72	56,52
H	5,82	5,87
N	5,09	5,00
O	11,64	11,33
F	20,73	20,48

#### EJEMPLO 3: Determinación del polimorfismo de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida

10

**[0052]** Se analizó una muestra del producto cristalizado del Ejemplo 1 por:

- Difracción de rayos X en polvo con un aparato Rigaku Miniflex y utilizando radiación Cu-α<sub>1</sub> y radiación Cu-α<sub>2</sub>;
- Análisis por CBD con un aparato Perkin-Elmer DSC 6 y utilizando una velocidad de barrido de 10 °C/min en un intervalo de temperatura de 50-260 °C;
- Análisis infrarrojo con un Perkin-Elmer FT-IR Spectrum-one, en el que la muestra analizada es una suspensión en KBr.

15

**[0053]** El patrón de difracción de rayos X en polvo de una muestra de la forma polimórfica A del Ejemplo 1 se muestra en la Figura 1 y todos los valores 2-theta y de intensidad (cps) se presentan en la Tabla 1 anterior.

20

**[0054]** El espectro IR de la forma polimórfica A (Ejemplo 1) se muestra en la Figura 2. Las bandas IR (cm<sup>-1</sup>), representas en la Fig. 2 son las siguientes: 3.308,68, 3.067,42, 2.997,56, 2.971,26, 2.935,88, 2.882,97, 2.834,85, 2.740,58, 1.924,26, 1.642,03, 1.541,19, 1.480,60, 1.446,91, 1.424,54, 1.373,53, 1.330,93, 1.253,96, 1.234,94, 1.209,04, 1.165,17, 1.114,08, 1.068,67, 1.047,11, 1.031,50, 1.020,76, 954,22, 916,98, 886,86, 835,75, 815,71, 757,32, 722,82, 692,97, 639,65, 590,06, 531,17, 508,96, 482,28.

25

**[0055]** Los espectros por CBD para la forma polimórfica A (obtenida a partir del Ejemplo 1) se muestran en la Figura 3, en la cual se indican temperaturas de inicio y temperaturas pico.

30

**[0056]** Entre todas las Figuras 1-5, resulta evidente que la forma A consiste en cristales isomorfos. No obstante, sobre la base de los valores recuperados en los diferentes análisis, la forma polimórfica A y la forma polimórfica B poseen una estructura cristalina diferente.

#### EJEMPLO 4: Evaluación de las características físico-químicas de una muestra de la forma polimórfica A

**[0057]** Se analizó una muestra de la forma polimórfica A obtenida como en el Ejemplo 1 y después se micronizó a menos de 10 micrómetros.

40 **[0058]** Los resultados del análisis se dan en la siguiente Tabla 6.



Tabla 6: Características físico-químicas de la forma polimórfica A

	Forma polimórfica A
Descripción	polvo blanco cristalino
Punto de fusión (°C)	73,2 °C
Agua (ajuste por KF) (%)	inferior a 0,01
Ensayo (volumétrico, en base anhidra) (%)	99,5
Pureza cromatográfica (%)	0,05

**[0059]** El polimorfo parecía ser cristalino, con una elevada pureza. Además, la forma polimórfica A parecía un polvo totalmente cristalino. Debido a esta característica, a partir de la cual se obtiene una mejor trabajabilidad y manipulación, la forma polimórfica A se consideró el mejor candidato para la preparación de composiciones farmacéuticas.

**[0060]** La muestra de polvo (forma A) se utilizó con el fin de evaluar las propiedades de solubilidad del polimorfo en diferentes pHs.

**[0061]** La muestra se ensayó en las siguientes condiciones de pH:

- Tampón de ácido clorhídrico en pH = 1,2
- Ácido acético en pH = 3,0
- Tampón fosfato en pH = 3,0
- Tampón fosfato en pH = 4,6
- Tampón fosfato en pH = 6,0
- Tampón fosfato en pH = 7,4
- Tampón fosfato alcalino en pH = 8,0

**[0062]** Se disolvieron 0,5 g de la muestra en un matraz de vidrio utilizando 100 ml del tampón apropiado. La muestra se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Si se completaron las muestras disueltas, se añadió 1 gramo adicional en el matraz y se agitó durante 30 minutos. El procedimiento se repitió hasta la presencia de un producto no disuelto en el fondo del matraz. Después de dicho procedimiento de disolución, las muestras se almacenaron durante 24 horas y, a continuación las cantidades disueltas de la forma A se determinaron por un ensayo por HPLC.

**[0063]** Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 7:

Tabla 7: Solubilidad de la forma polimórfica A en diferentes pHs

pH	Forma polimórfica A	
	Solubilidad (µg/ml)	
	Evaluación inicial	Tras 24 horas
1,2	152,58	159,79
3,0 (ácido acético)	123,88	160,12
3,0 (tampón fosfato)	116,50	150,75
4,6	132,41	145,44
6,0	118,44	139,92
6,8	106,03	164,22
7,4	117,16	139,97
8,0	133,86	141,89
Agua	137,80	164,19

**[0064]** La solubilidad del compuesto no se vio afectada por el pH y en este caso también, las diferencias mínimas no fueron significativas. Las solubilidades eran bajas, lo que confirma la elevada estabilidad del polimorfo. Tras haber transcurrido 24 horas, la solubilidad aumentó de 10-30 % en las diferentes condiciones de pH. De acuerdo con este ensayo, la forma A puede utilizarse para preparar medicamentos.

EJEMPLO 5: Ensayos farmacológicos**[0065]**

- 5 A) Evaluación de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)bencil]-4-metoxibutiramida en el tratamiento de la dependencia del alcohol.

10 **[0066]** Los ensayos se llevaron a cabo en ratas Sardinian (sP) con preferencia hacia el alcohol, es decir, una línea de roedores genéticamente seleccionada por su consumo de alcohol espontáneo. Estos animales se adoptaron como el modelo animal específico principal en el programa de investigación debido al hecho de que estas ratas (mantenidas en un régimen de libre elección entre agua y una solución de etanol al 10 %) consumen grandes cantidades de alcohol (6-7 g/kg/día), compartiendo una gran preferencia por el compuesto ensayado (80-100 %).

15 **[0067]** En el estándar, estas ratas se someten a un régimen de libre elección con dos botellas de alcohol al 10 % y agua con acceso ilimitado (24h/día) en una jaula, y muestran estas características: ingesta diaria de aproximadamente 6 g/kg de alcohol; relación preferente (solución de alcohol frente a líquido total) superior al 80 %; fraccionamiento de la ingesta diaria de alcohol en 3-4 atracones; consecución de los NAS (niveles de alcohol en sangre) superiores al 50 % en mg en cada atracón; inducción de efectos farmacéuticos (ansiólisis, estimulación motora) y regulación por un mecanismo de nivel de referencia hedónico central.

20 **[0068]** Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con los siguientes modelos:

1. Ingesta de alcohol espontánea en ratas sP sin privar
2. Efecto de la privación de alcohol en ratas sP privadas.

25

1. Ingesta de alcohol espontánea en ratas sP sin privar

30 **[0069]** De acuerdo con este modelo, la ingesta de alcohol en un régimen de libre elección entre dos botellas representa la fase de "bebida activa" del alcoholismo humano. Por lo tanto, los compuestos activos ensayados han de disminuir la propensión de las ratas a consumir alcohol. Los resultados completos en este modelo demostraron que la forma polimórfica A disminuye la ingesta de alcohol en un amplio intervalo de dosis (10-100 mg/kg) tras la administración aguda intragástrica. Es importante subrayar que el efecto antialcohólico era específico, puesto que la disminución de la ingesta de alcohol no se relacionó con un efecto sedante, como se demuestra por el aumento compensatorio de la ingesta de agua y por la ingesta normal de alimentos en ratas sP (datos no presentados). En la Figura 5A se muestran los resultados de un único experimento. En concreto, se administraron dosis de 10, 20, 25 y 50 mg/kg de la forma polimórfica A y se evaluó la ingesta de alcohol. Sorprendentemente, dosis tan bajas como 10 mg/kg redujeron significativamente la ingesta de alcohol.

2. Efecto de la privación de alcohol en ratas sP privadas

40

45 **[0070]** Para caracterizar mejor el efecto antialcohólico de la forma polimórfica A, este compuesto se evaluó en el efecto de privación de alcohol (EPA). EPA es un aumento temporal bien documentado de la ingesta de alcohol en ratas alcohólicas que se produce después de un periodo de abstinencia, y un modelo para aquellas con necesidad de continuar consumiendo alcohol de forma compulsiva e incontrolada y que tienen un comportamiento caracterizado por las recaídas de alcohol. De acuerdo con este modelo, las ratas sP que experimentaron con alcohol se sometieron a un periodo de abstinencia de dos semanas durante el cual no se tuvo acceso al etanol. Una vez transcurrido este periodo, a los animales se les administró una forma polimórfica A 30 minutos antes de apagar las luces, y luego en el momento de volver a acceder al alcohol. Se midió la ingesta 1 hora después de haber apagado las luces.

50

55 **[0071]** Los resultados se representan en la Figura 5B y 5C para dosis elevadas y pequeñas dosis de la forma polimórfica A cristalina, respectivamente. La forma polimórfica A suprimió completamente el efecto EPA que muestra una actividad muy buena en un intervalo de dosis de 5-100 mg/kg. Es más, dosis tan bajas como 5 mg/kg fueron capaces de abolir por completo el consumo extra de alcohol.

EJEMPLO 6: Evaluación de la farmacología de seguridad, toxicología y genotoxicidad de la forma polimórfica A.1. Farmacología de seguridad

60 **[0072]** Los posibles efectos adversos de la forma polimórfica A en las funciones del SNC, cardiovascular, respiratorio e inmunitario se evaluaron *in vitro* e *in vivo* (ratas y perros) en diferentes modelos experimentales. En los ensayos *in vivo*, siempre se administró el compuesto ensayado por medio de una única administración oral en dosis de 100, 300 y 1.000 mg/kg.

65

## A) Sistema del SNC

- Ensayo de Irwin y temperatura corporal en ratas

5 **[0073]** Los efectos neuroconductuales de la forma polimórfica A se han investigado de acuerdo con el ensayo de Irwin utilizando una batería de observación convencional, que permite la evaluación tanto de las actividades del sistema nervioso central como periférico (por ejemplo, actividad motora, coordinación motora, respuestas somáticas sensoriales/reflejo motor, respuestas autonómicas); la temperatura corporal se midió por medio de un termómetro electrónico. El compuesto indujo en 100 mg/kg una disminución transitoria de la actividad locomotora espontánea; en dosis superiores, el efecto en la locomoción era más marcado y de duración mayor y se asoció a un efecto miorelajante y a una disminución del conocimiento. En 1.000 mg/kg, las ratas mostraron una posición de puntillas, atáxica y, posteriormente, una postura de descanso recostada o aplanada; todos los efectos eran reversibles. La temperatura corporal no se vio afectada en 100 mg/kg, aunque en dosis superiores se apreció una disminución significativa en la temperatura corporal hasta cuatro horas.

15

- Tiempo de sueño en las ratas por medio de hexobarbital

**[0074]** El ensayo consiste en la medición de la duración del sueño inducido por hexobarbital; sustancias con una acción sedante o anti-sueño que provocan el aumento o disminución, respectivamente, de la duración del sueño inducido por hexobarbital. No se apreció efecto significativo estadístico alguno en el tiempo necesario para conciliar el sueño o en la duración del sueño en la dosis más pequeña (100 mg/kg). En la dosis intermedia se registró una ligera disminución en la duración del sueño, mientras que en la dosis superior se observó una disminución significativa del tiempo necesario para conciliar el sueño y en la duración del sueño.

20

25 - Actividad proconvulsiva en ratas

**[0075]** En el estudio, se investigó un posible efecto proconvulsivo de la forma polimórfica A administrada en combinación con una dosis de pentilentetrazol, que induce las convulsiones; pretratamiento con sustancias que poseen propiedades proconvulsivas que condujeron a un inicio más rápido de las convulsiones. En todas las dosis administradas, la forma polimórfica A no tuvo efecto proconvulsivo significativo estadístico alguno, aunque en las dosis a 100 y 300 mg/kg indujo un aumento en el tiempo de ocurrencia de convulsiones, sugiriendo un posible efecto anticonvulsivo.

30

## B) Aparato cardiovascular

35

*In vitro*

- Células HERG (células del gen humano relacionado con éter)

40 **[0076]** Se investigó un posible efecto de bloqueo de la forma polimórfica A en la cola del estímulo Herg registrado a partir de células HEK-293 (células renales embrionarias humanas) transfectadas de forma estable con ADNc HERGG-1. El método consistió en la medición de la cola del estímulo HERG utilizando técnicas de pinzamiento zonal en la configuración de la célula entera. Los compuestos que inhibieron el estímulo HERG se reconocieron por prolongar el potencial de acción cardíaca y aumentar el intervalo QT.

45

**[0077]** Los resultados obtenidos indicaron que la forma polimórfica A no indujo inhibición estadísticamente significativa alguna de la cola del estímulo HERG en  $10^{-7}$  M; en las concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, se observó una ligera disminución y no dependiente de la dosis y solo en la mayor concentración ensayada a  $10^{-4}$  M se produjo una reducción de aproximadamente el 50 %. Es esencial subrayar que la inhibición nunca alcanzó el valor de 70 %, que se considera el valor del umbral a considerar un compuesto activo en este ensayo.

50

- Fibras de Purkinje

55 **[0078]** Un posible efecto adverso inducido por la forma polimórfica A en el potencial de acción cardíaca se evaluó en fibras de Purkinje caninas aisladas. El potencial de acción transmembrana se midió por medio de la técnica de microelectrodos intracelulares; este método se recomienda para detectar la capacidad de una sustancia que induce la prolongación del intervalo QT. La forma polimórfica A en concentraciones de  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M no tuvo efecto estadísticamente significativo alguno en los parámetros del potencial de acción en cualquiera de los índices de estimulación normales o bajos; en la concentración superior de  $10^{-4}$  M se observó una disminución significativa en la duración del potencial de acción de repolarización. En todas las concentraciones ensayadas no se registró ni despolarización temprana ni tardía.

60

**[0079]** Estos resultados indican que, partiendo del perfil electrofisiológico de la forma polimórfica A, no ha de esperarse ninguna PR (puntas retorcidas) o prolongación del intervalo QT; la forma polimórfica A puede clasificarse entre los fármacos capaces de no inducir PR o prolongación del intervalo QT en seres humanos.

65

*In vivo*

## - Evaluación cardiovascular en perros conscientes

5 **[0080]** Se evaluó cualquier posible efecto de la forma polimórfica A administrada en dosis de 100, 300 y 1.000 mg/kg por vía oral en la presión arterial, la frecuencia cardíaca y en el electrocardiograma en perros conscientes, con movimiento libre, equipados previamente con transmisores de telemetría. En la primera parte del estudio, solo se registraron mediciones telemétricas; el registro de los parámetros comenzó al menos 24 horas antes de la administración del compuesto y se continuó durante 24 horas después de la dosificación. En la segunda parte, se administró únicamente la dosis máxima de 1.000 mg/kg y se realizaron investigaciones complementarias, tales como un electrocardiograma de 6 derivaciones (derivaciones I, II, III, aVL, aVR y aVF), muestras sanguíneas y la observación de los animales antes del tratamiento y 3 horas post-tratamiento.

15 **[0081]** *Primera Parte:* La forma polimórfica A administrada a 100 mg/kg no indujo cambios relevantes en la presión arterial, en la frecuencia cardíaca y en el rastreo con electrocardiograma (en particular, no hay cambios en la morfología de la onda T). Cuando se administra a 300 y 1.000 mg/kg, se registraron un ligero aumento de la presión arterial (referida a presión arterial sistólica y diastólica), una ligera disminución de las duraciones del intervalo PR y PQ y un ligero aumento en la duración del intervalo QT corregido para la frecuencia cardíaca con el método de Sarma. Los cambios observados en 300 mg/kg eran muy ligeros y aislados y por consiguiente, no atribuibles a un efecto farmacológicamente relevante de la forma polimórfica A como los cambios en la duración del intervalo PR y PQ observados en 1.000 mg/kg, mientras que el aumento de la duración del intervalo QT corregido para la frecuencia cardíaca se relacionó claramente con un efecto de la forma polimórfica A, lo que sugiere un aumento de la duración de la repolarización ventricular. No se observó alteración alguna en el electrocardiograma (derivación II) y, en particular, no se observó cambio alguno en la morfología de la onda T en todas las dosis ensayadas.

25 **[0082]** *Segunda parte:* No se observó alteración alguna en el electrocardiograma de 6 derivaciones antes y 3 horas después de la dosificación con la forma polimórfica A en la dosis de 1.000 mg/kg. Todos los animales vomitaron entre 0,5 y 17 horas después de la dosificación. El análisis de plasma confirmó la presencia de la forma polimórfica A en el plasma 3 horas después de la administración.

30 **[0083]** Estos resultados indican que la forma polimórfica A, administrada en dosis de 100, 300 y 1.000 mg/kg por vía oral indujo solo en 1.000 mg/kg una ligera hipertensión asociada a un aumento en la duración de la repolarización ventricular.

## 35 C) Sistema respiratorio

## - Evaluación de las vías respiratorias en ratas conscientes

40 **[0084]** Se evaluó el efecto de la forma polimórfica A en los parámetros respiratorios (frecuencia respiratoria, flujos inspiratorios máximos y flujos espiratorios máximos, tiempos de inspiración y espiración, índice de resistencia de las vías respiratorias, volumen por minuto y volumen de ventilación pulmonar) en ratas conscientes tras la administración oral única. La respiración se midió por el método de pletismografía corporal completa. La forma polimórfica A en 100 mg/kg no tuvo efecto relevante alguno sobre los parámetros respiratorios, a 300 y 1.000 mg/kg indujo taquipnea asociada a una reducción transitoria en el volumen de ventilación pulmonar. No se observaron cambios estadísticos en los flujos inspiratorios máximos y en los flujos espiratorios máximos, en el volumen por minuto o en el índice de resistencia de las vías respiratorias, lo que sugiere que el compuesto de ensayo no causó efecto depresor respiratorio o broncoconstrictor alguno.

## 50 D) Sistema inmunitario

## - Ensayo de CFP en ratas

55 **[0085]** Un posible efecto de la forma polimórfica A en el sistema inmunitario se evaluó utilizando el sistema del método de células formadoras de placa (CFP) en la rata, seguido de la administración oral a las ratas durante 28 días en dosis de 150, 250 y 500 mg/kg. El método se basa en la estimulación del sistema inmunitario con un agente antigénico (glóbulos rojos de oveja) y en la evaluación del efecto del artículo de ensayo en la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria se evaluó midiendo la proporción de esplenocitos que producen anticuerpos contra el agente antigénico (células formadoras de placa) en presencia del complemento. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que la forma polimórfica A tenía una actividad inmunosupresora ligera y no dependiente de la dosis; en las dosis más pequeñas ensayadas (150 y 250 mg/kg) se produce un efecto límite comparable que solo se vuelve más evidente en la dosis mayor (500 mg/kg). De hecho, el análisis estadístico demostró una significatividad a 150 mg/kg, pero no a 250 mg/kg; estos hallazgos podrían indicar que los efectos observados en estas dosis podrían deberse a la variabilidad normalmente presente en este ensayo ya que la heterogeneidad en la respuesta inmunitaria es a menudo apreciada y es probable que esté relacionada con las diferencias individuales en la sensibilidad inmunitaria.

[0086] Se han llevado a cabo todos los estudios mencionados anteriormente para farmacología de seguridad siguiendo las normas de BPL y de conformidad con la directriz ICH S7A para la farmacología de seguridad.

## 2. Toxicología y genotoxicidad

[0087] Los estudios de toxicidad únicos y de dosis repetidas en roedores y en no roedores se llevaron a cabo para apoyar los ensayos clínicos del compuesto de ensayo, es decir, la forma polimórfica A. Se llevaron a cabo estudios de toxicidad únicos en ratones y ratas por las vías intraperitoneal y oral. Se realizaron estudios orales reiterados (28 días de administración seguido de un periodo de recuperación de 14 días) en ratas y perros.

[0088] Los ensayos de Ames y micronúcleos se llevaron a cabo para investigar el potencial genotóxico del compuesto.

[0089] La siguiente Tabla 8 resume los estudios llevados a cabo con la forma polimórfica A.

Tabla 8: Toxicidad y genotoxicidad de la forma polimórfica A.

Tipo de estudio	Especie	Vía	Dosis-Intervalo (mg/kg)	Programa	Resultados
Toxicidad aguda	Ratón	<i>ip</i> <i>os</i>	200-1.000 2.000-4.000	Único	LD <sub>50</sub> ~800 LD <sub>50</sub> >4.000
Toxicidad aguda	Rata	<i>ip</i> <i>os</i>	200-1.000 2.000-4.000	Único	LD <sub>50</sub> ~800 LD <sub>50</sub> >4.000
Toxicidad subcrónica	Rata	<i>os</i>	50-1.550/1.200	4 semanas + recuperación	NENO* 100
Toxicidad subcrónica	Perro	<i>os</i>	125-1.125/900	4 semanas + recuperación	NENO* 125
Ensayo de Ames para genotoxicidad Ensayo de micronúcleos	<i>S. Typhimurium</i> Rata (células de la médula ósea)	<i>in vitro</i> <i>os</i>	3-500 µg/ml 500-2.000	/ Único	Negativo Negativo

\*NENO: Nivel de efectos no observables

[0090] La genotoxicidad se evaluó con el ensayo de AMES y el ensayo de micronúcleos en la rata.

- Ensayo de mutación inversa en *Salmonella Typhimurium* (ensayo de Ames)

[0091] El potencial mutagénico de la forma polimórfica A se evaluó *in vitro* en el ensayo de mutación inversa en *Salmonella Typhimurium* según las directrices de la CE. El compuesto ensayado no indujo mutaciones génicas por cambios en los pares de bases o desplazamientos del marco del genoma de las cepas de *Salmonella Typhimurium* ensayadas (TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 y TA102) en concentraciones que oscilan desde 50 a 3.000 µg/ml con y sin activación metabólica. Por lo tanto, la forma polimórfica A puede considerarse no mutagénica en este ensayo de mutación inversa en *Salmonella Typhimurium*.

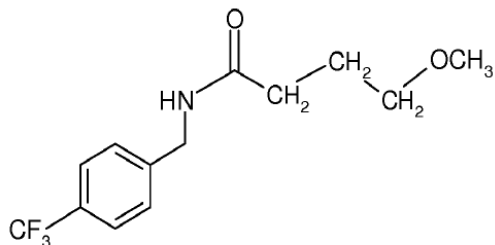
- Ensayo de micronúcleos

[0092] Cualquier actividad clastogénica o veneno del huso de la forma polimórfica A se investigó mediante la detección de eritrocitos policromáticos micronucleados en la médula ósea de las ratas tratadas. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la CE. El método consiste en la búsqueda de la presencia de un fragmento cromosómico, o un número de cromosomas, originando una deleción o un efecto del veneno del huso mitótico, en los eritrocitos policromáticos de la médula ósea. Los productos clastogénicos pueden producir, en el momento de la mitosis, ruptura cromosómica, cuando los venenos del huso alteran la estructura de los husos mitóticos. Un fragmento acéntrico de un cromosoma que no ha migrado habitualmente no se retiene en el núcleo de la célula hija, y aparece en el citoplasma. Así pues se conoce como un cuerpo de Howell-Jolly o micronúcleos. Los micronúcleos pueden detectarse en los eritrocitos policromáticos, ya que estas células expulsan su núcleo principal poco después de la última mitosis y los micronúcleos permanecen en los glóbulos rojos. Las ratas macho y hembra Sprague Dawley se trataron por vía oral una vez con 2.000-1.000-500 mg/kg de la forma polimórfica A y 24 y 48 horas después del tratamiento sus fémures se muestrearon y se extrajeron las células de la médula ósea.

[0093] En todas las dosis y tiempos ensayados, la forma polimórfica A no indujo actividad clastogénica alguna.

## REIVINDICACIONES

1. Forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida de fórmula:



(I)

5

que posee los siguientes picos en grados de difracción (2-theta) en el patrón de difracción de rayos X en polvo  $\pm 0,2$ :

9,7; 12,0; 18,0; 24,1; 25,9.

10

2. Forma polimórfica A según la reivindicación 1, que posee los siguientes picos en grados de difracción en el patrón de difracción de rayos X en polvo  $\pm 0,2$ :

Pico	2-theta
1	6,0
2	9,7
3	11,0
4	12,0
5	17,6
6	18,0
7	18,7
8	18,9
9	19,6
10	20,7
11	21,6
12	22,2
13	23,4
14	24,1
15	24,7
16	25,9
17	26,2
18	28,2

15 3. Un proceso de preparación de la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida de la reivindicación 1 o 2, que comprende las siguientes etapas:

- 20 i) hacer reaccionar 4-trifluorometilencilamina con 4-metoxibutirato de metilo en presencia de un catalizador para obtener así N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto; y
- ii) obtener una forma polimórfica A cristalina a partir de una solución de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida en bruto en un disolvente orgánico, donde dicha solución se siembra con la forma polimórfica A de N-[4-(trifluorometil)encil]-4-metoxibutiramida, y en la que el disolvente orgánico se selecciona entre tolueno y una mezcla de acetato de etilo/n-hexano.



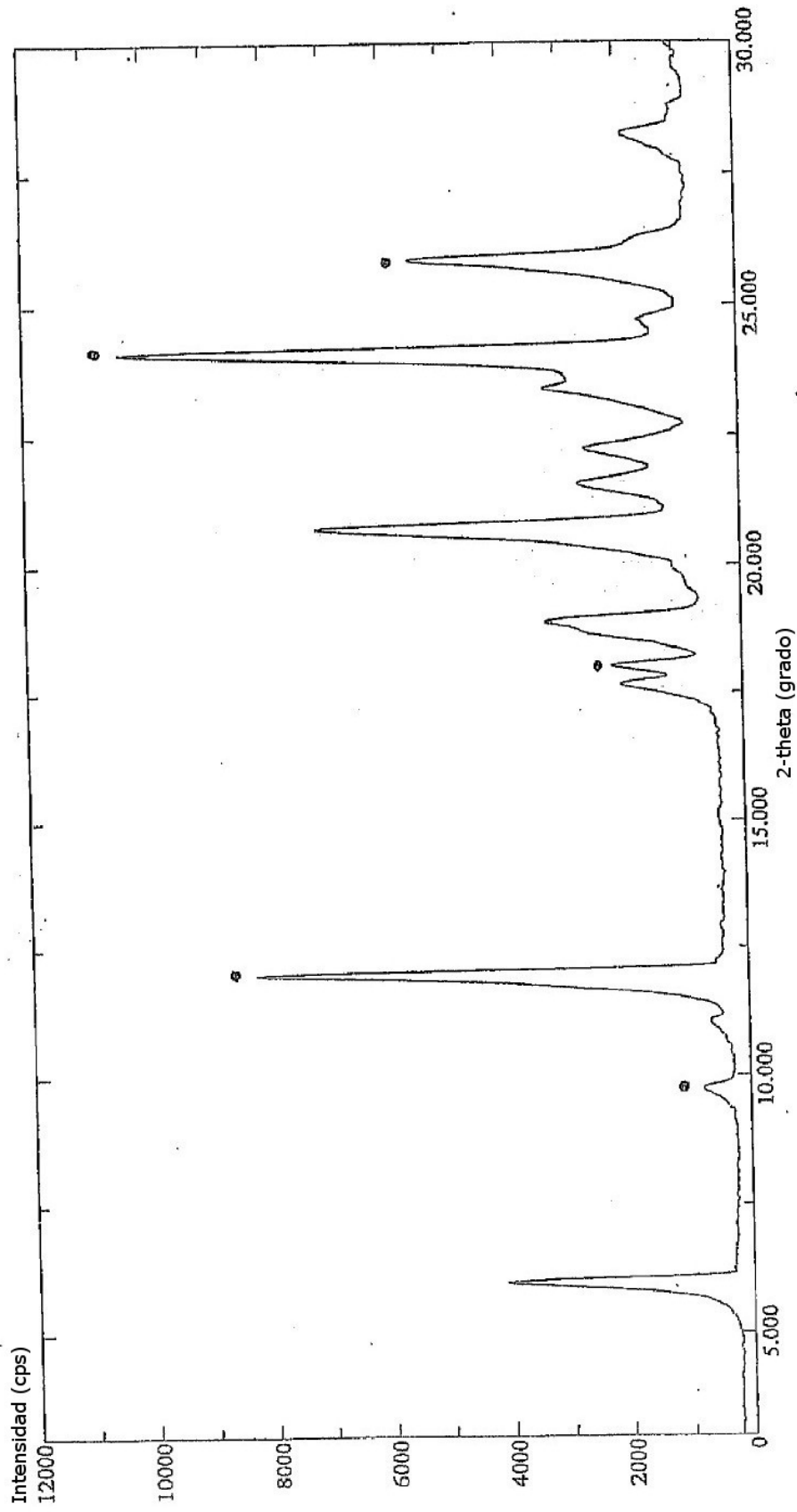


FIGURA 1



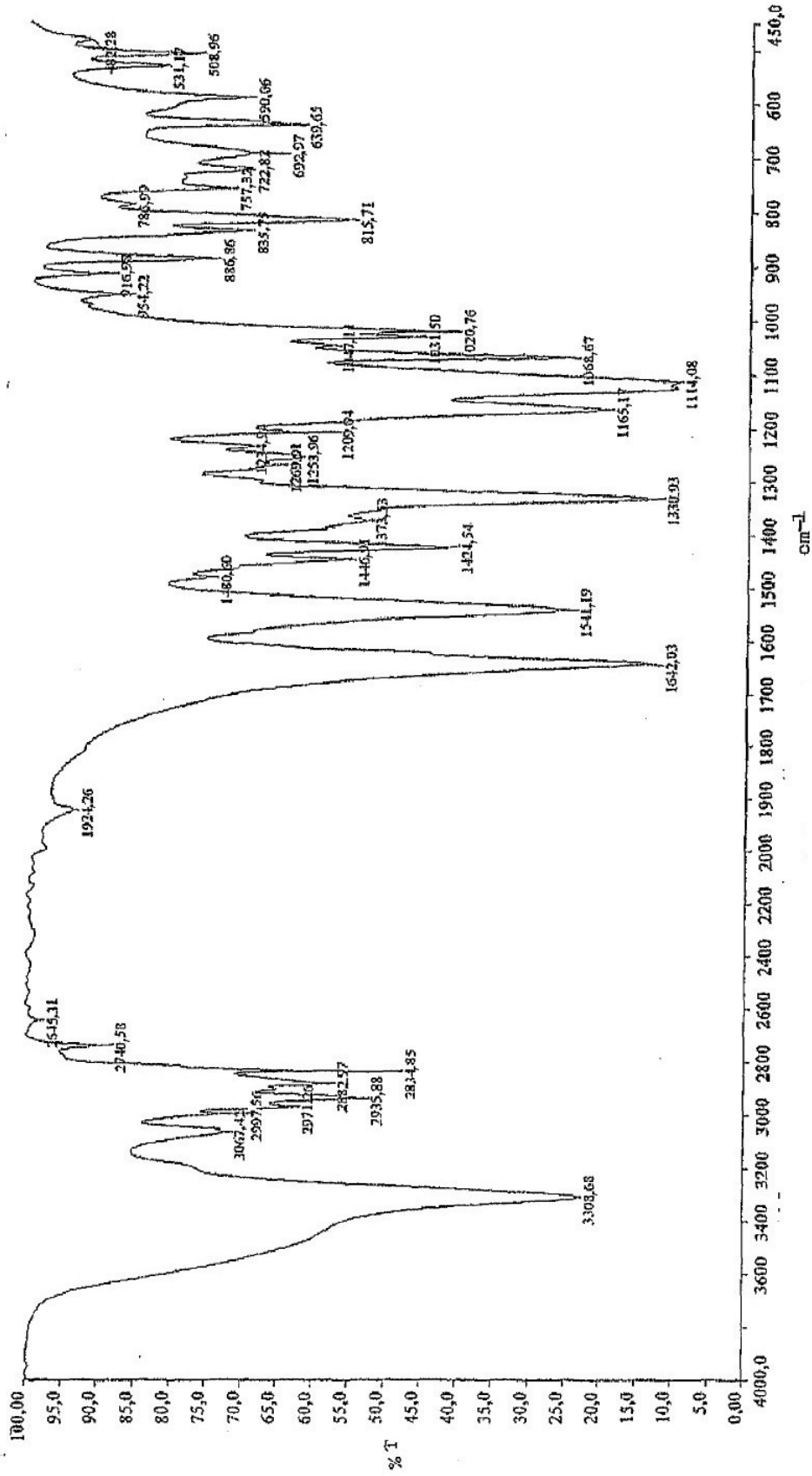


FIGURA 2

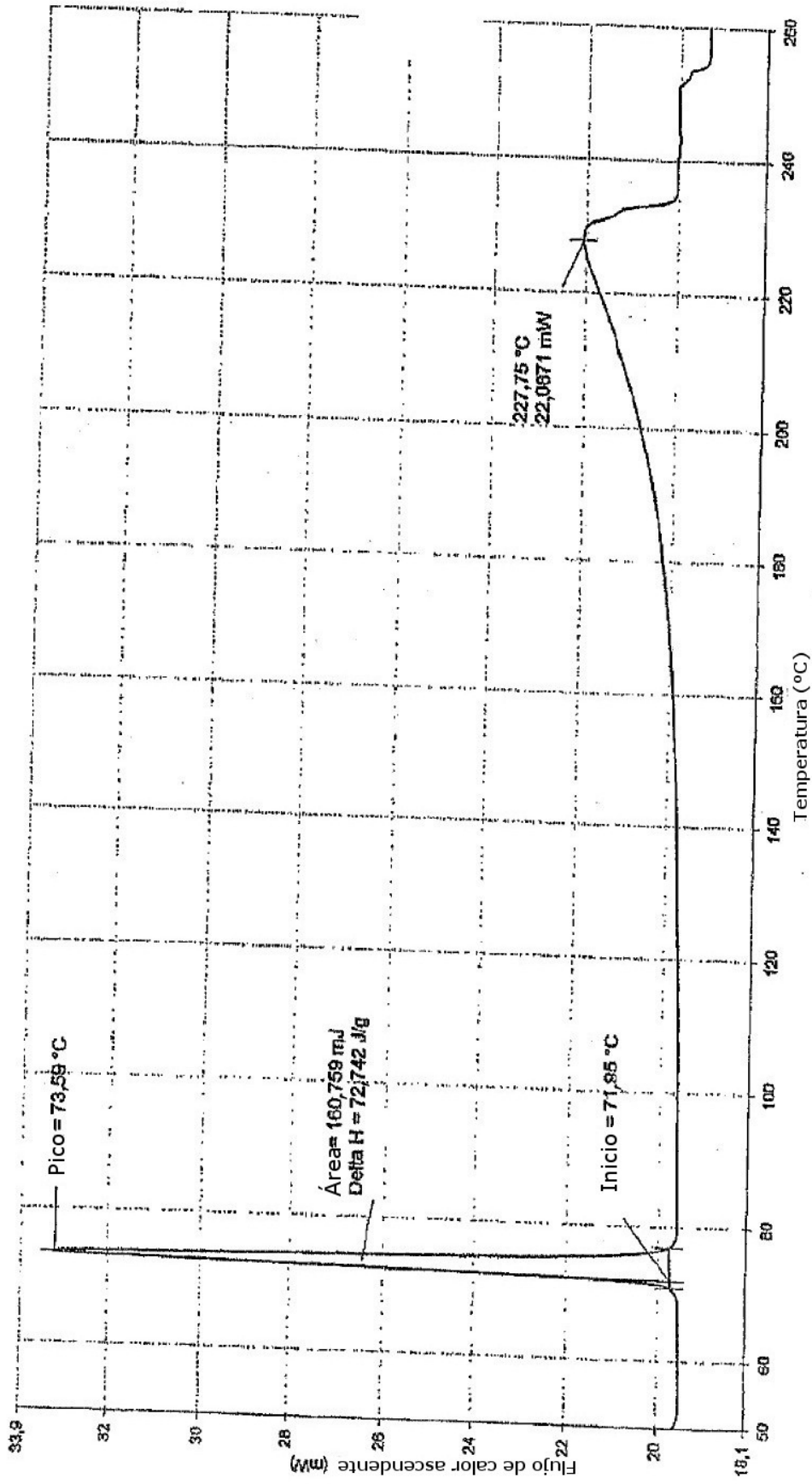


FIGURA 3

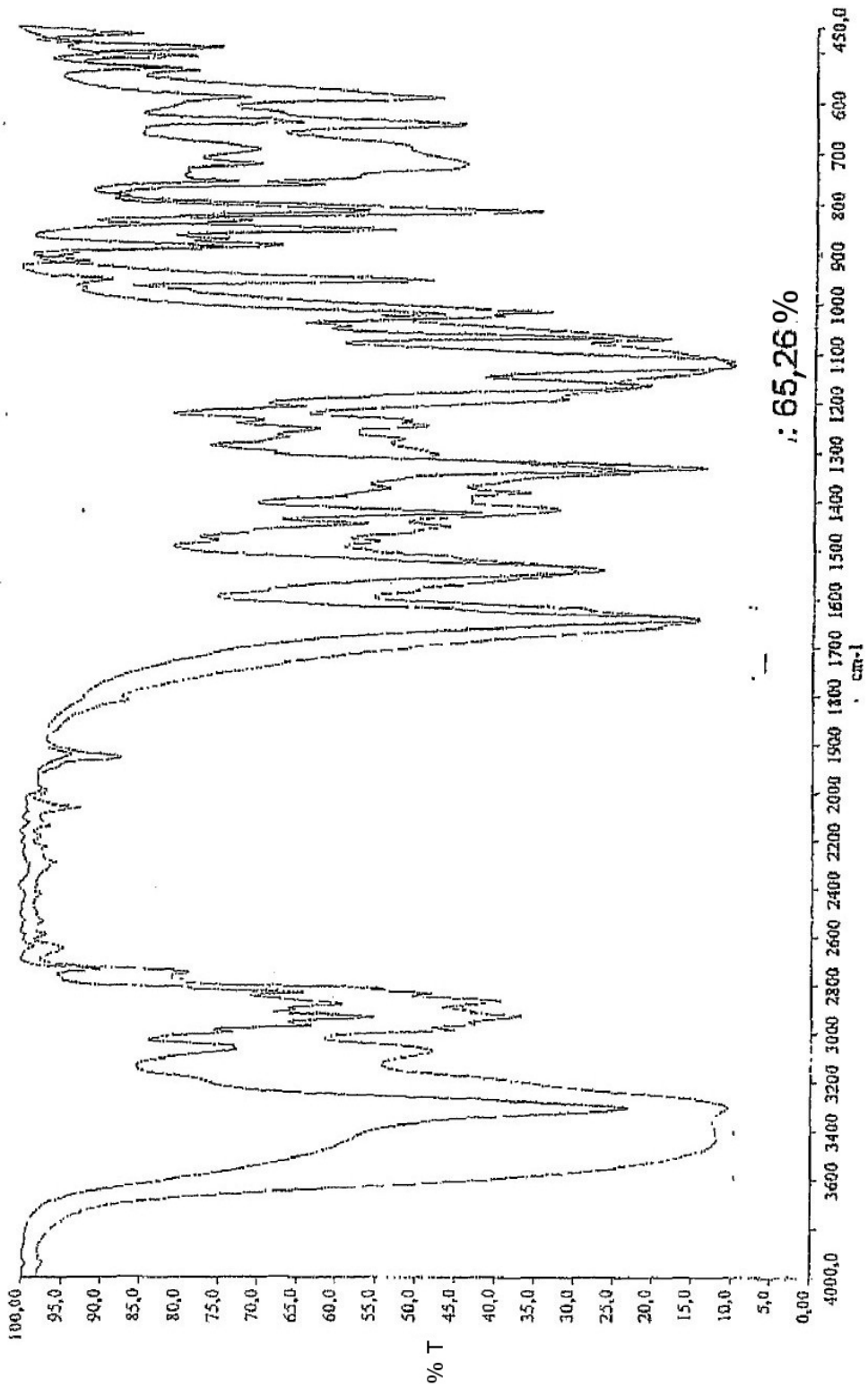
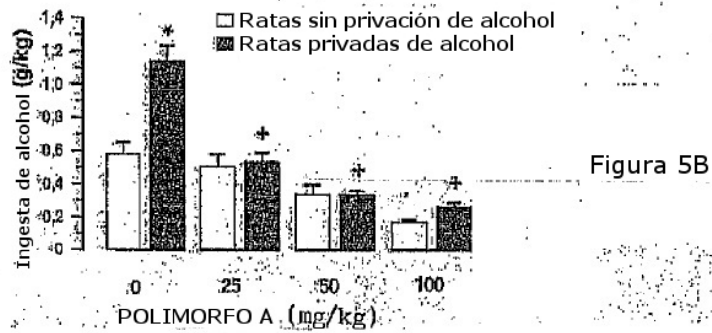
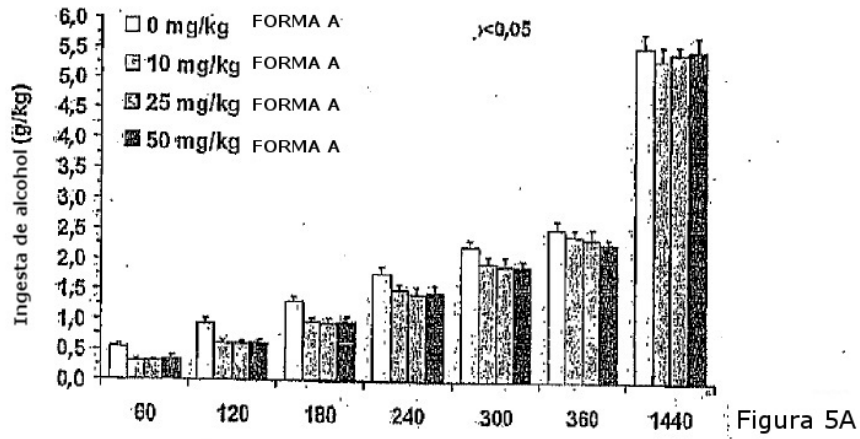
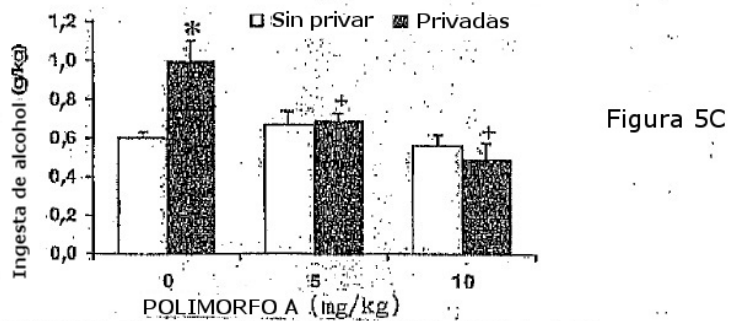


FIGURA 4



\*: con respecto a las ratas sin privar de alcohol tratadas con la FORMA A con 0 mg/kg  
 +: con respecto a las ratas privadas de alcohol tratadas con la FORMA A con 0 mg/kg

Los datos se refieren a la primera hora o al re acceso al alcohol (cuando EPA se pronuncia al máximo en las ratas sP)



\*: con respecto a las ratas sin privar de alcohol tratadas con la FORMA A con 0 mg/kg  
 +: con respecto a las ratas privadas de alcohol tratadas con la FORMA A con 0 mg/kg

Los datos se refieren a la primera hora o al re acceso al alcohol (cuando EPA se pronuncia al máximo en las ratas sP)