

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 243**

51 Int. Cl.:

C07D 317/72 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2011 PCT/JP2011/071557**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO2012039447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2011 E 11826892 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2620434**

54 Título: **Procedimiento de preparación de cristales de un derivado de cicloalqueno sustituido**

30 Prioridad:

24.09.2010 JP 2010213236

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
 3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
 Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**OHKAWA, NOBUYUKI;
 IIDA, KOUKI y
 NAGASAKI, TAKAYOSHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 620 243 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 preparación de cristales de un derivado de cicloalqueno sustituido

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar cristales de derivados de cicloalqueno sustituidos que tienen la actividad de suprimir la transducción de señales intracelulares o la activación celular en diversas células tales como monocitos, macrófagos y células endoteliales vasculares inducidas por endotoxina y de suprimir la producción de un mediador inflamatorio tal como el TNF- α , causado por la transducción de señales intracelulares o la activación celular, y que son útiles como un agente profiláctico y/o terapéutico para diversas enfermedades tales como septicemia (choque séptico, coagulación intravascular diseminada, insuficiencia de múltiples órganos, etc.).

Técnica anterior

10 La endotoxina (lipopolisacárido: LPS), que es un componente de la membrana de las bacterias, actúa sobre células tales como monocitos, macrófagos y células endoteliales vasculares, induce la sobreproducción de diversos mediadores inflamatorios tales como TNF- α y similares, provoca hipotensión súbita, trastornos de la coagulación de la sangre, trastornos circulatorios y similares, además de las respuestas inflamatorias sistémicas y, por lo tanto, desarrolla septicemia (véase, por ejemplo, el documento no de patente 2). El lipopolisacárido y el lípido A, que corresponde a una estructura parcial del mismo, activan la transducción de la señal intracelular vía TLR4 (receptor tipo Toll 4), que es un receptor de superficie celular funcional, después de unirse a CD14 (véase, por ejemplo, el documento no de patente 3), de modo que se inician varias respuestas celulares representadas por la producción de mediadores inflamatorios. Por lo tanto, se considera que una sustancia capaz de suprimir la transducción de señales intracelulares o la activación celular inducida por endotoxina y diversas respuestas celulares, que son inducidas por tal transducción de señales intracelulares o activación celular y representadas por la sobreproducción de mediadores inflamatorios tales como TNF- α , puede ser un agente profiláctico y terapéutico eficaz para la septicemia (véanse, por ejemplo, los documentos no de patente 3 y 4 y los documentos de patente 1 y 2).

25 La transducción de señales intracelulares o la activación celular inducida por endotoxina y diversas respuestas celulares tales como la sobreproducción de mediadores inflamatorios incluyendo TNF- α , etc., inducidas por la transducción de señales intracelulares o la activación celular, llevan al desarrollo y progreso de diversas enfermedades tales como trastorno cerebral isquémico, arteriosclerosis, mal pronóstico después de angioplastia coronaria, insuficiencia cardíaca, diabetes, complicaciones de la diabetes, artritis, osteoporosis, osteopenia, enfermedades autoinmunitarias, trastornos de los tejidos y rechazo después del trasplante de órganos, infección bacteriana, infección vírica, gastritis, pancreatitis, nefritis, neumonía, hepatitis y leucemia, además de la septicemia descrita anteriormente (por ejemplo, el documento no de patente 5 y el documento de patente 3).

35 Los presentes inventores realizaron estudios intensivos para resolver los problemas anteriores y, como resultado, encontraron que hay un grupo de compuestos que tienen un efecto deseado entre derivados de cicloalqueno sustituidos (documento de patente 4). Sin embargo, los derivados de cicloalqueno sustituidos (en la forma libre) son amorfos y tienen higroscopicidad. En vista de esto, los presentes inventores estudiaron sus sales farmacológicamente aceptables. Sin embargo, no fue fácil encontrar cristales que tuvieran estabilidad en almacenamiento y durante la manipulación y, por lo tanto, su industrialización resultaba extremadamente difícil.

Documentos de la técnica anterior**Documentos de patente**

40 Documento de patente 1: JP-A-2000-178246
Documento de patente 2: JP-A-2004-2370
Documento de patente 3: WO 2000/41698
Documento de patente 4: WO 2007/032362

Documentos no de patentes

45 Documento no de patente 1: Iqbal y col., Expert Opin. Emerging Drugs, Vol. 7, página 111, 2002
Documento no de patente 2: Hawkins y col., Current Topics in Medicinal Chemistry, Vol. 4, página 1147, 2004
Documento no de patente 3: Beutler, Nature, Vol. 430, páginas 257-263, 2004
Documento no de patente 4: Kakutani y col., Inflammation Research, Vol. 48, página 461, 1999
Documento no de patente 5: Donald N. Cook y col., Nature Immunology, Vol. 5, páginas 975-979, 2004

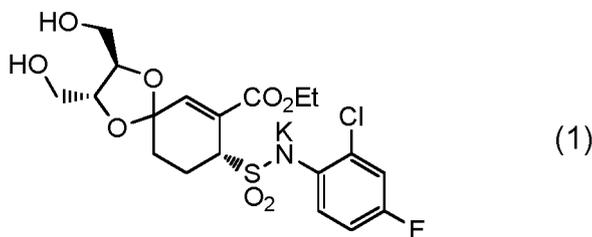
Sumario de la invención**Problemas a resolver mediante la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar cristales de derivados de cicloalqueno sustituidos que tengan una excelente estabilidad en almacenamiento y manipulación.

Medios para resolver los problemas

Es decir, la presente invención se refiere a:

un procedimiento para producir un cristal de (2-cloro-4-fluorofenil){[(2R,3R,8R)-7-(etoxicarbonil)-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-en-8-il]sulfonil}azanida de potasio representado por la siguiente fórmula (1):



que muestra picos característicos en los ángulos de difracción 2θ ($^{\circ}$) de 3,82, 7,64, 11,48, 19,06, 23,08, 25,22 y 26,98 (± 2 , respectivamente) en difracción de rayos X en polvo obtenida por irradiación con radiación $K\alpha$ de cobre, caracterizado por la adición de una solución de 2-etilhexanoato de potasio hidrato en acetato de etilo gota a gota a una solución o suspensión de (2R,3R,8R)-8-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil]-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-eno-7-carboxilato de etilo, disolviendo en acetato de etilo, calentando a reflujo y enfriando.

Ventajas de la invención

De acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar cristales de derivados de cicloalqueno sustituidos con una excelente estabilidad en almacenamiento y manipulación. Las sales de potasio (cristales) de derivados de cicloalqueno sustituidos suprimen la producción de un mediador inflamatorio causada por la transducción de señales intracelulares o la activación celular inducida por endotoxina y son eficaces como agentes profilácticos y/o terapéuticos para la septicemia.

Breve descripción de los dibujos

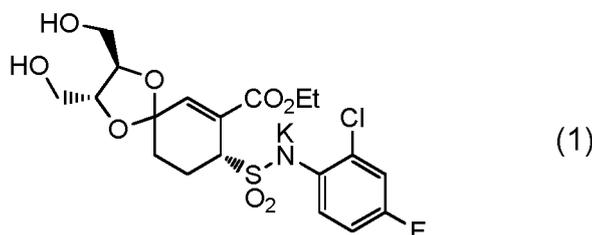
[Fig. 1] La Fig. 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo de un cristal obtenido en el ejemplo 1. En el dibujo, la ordenada indica la intensidad de difracción en unidades de recuentos/s (cps) y la abscisa indica el valor del ángulo de difracción 2θ .

[Fig. 3] La Fig. 3 muestra las curvas de equilibrio de absorción y desorción de humedad de un compuesto (en forma libre) del Ejemplo Comparativo en un ensayo de absorción de humedad. En el dibujo, la ordenada indica el peso de una muestra y la abscisa indica la medida de la humedad. El "Ciclo 1 de Sorb" representa "una curva de equilibrio de absorción de humedad (en el primer ciclo)" y se traza un cambio en el peso frente a la humedad relativa en el momento de obtener un peso constante cuando la humedad se ha incrementado. El "Ciclo 1 de Desorb" representa una curva de equilibrio de desorción de humedad (en el primer ciclo)" y se traza el cambio en el peso frente a la humedad relativa en el momento de obtener un peso constante cuando se ha disminuido la humedad.

[Fig. 4] La Fig. 4 muestra las curvas de equilibrio de absorción y desorción de humedad de un compuesto del Ejemplo 1 en un ensayo de absorción de humedad. En el dibujo, la ordenada indica el cambio de peso de una muestra y la abscisa indica el ajuste de medición de la humedad. El "Ciclo 1 de Sorb" representa "una curva de equilibrio de absorción de humedad (en el primer ciclo)" y se traza un cambio en el peso frente a la humedad relativa en el momento de obtener un peso constante cuando la humedad se ha incrementado. El "Ciclo 1 de Desorb" representa "una curva de equilibrio de desorción de humedad (en el primer ciclo)" y se traza el cambio en el peso frente a la humedad relativa en el momento de obtener un peso constante cuando se ha disminuido la humedad.

Modo de realización de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un cristal de (2-cloro-4-fluorofenil){[(2R,3R,8R)-7-(etoxicarbonil)-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-en-8-il]sulfonil}azanida de potasio representado por la siguiente fórmula (1) (en lo sucesivo denominado a veces Compuesto (1) en la presente descripción):



Aquí, un cristal se refiere a un sólido cuya estructura interna está compuesta tridimensionalmente por una repetición regular de átomos constituyentes (o de un grupo de ellos), y se distingue de un sólido amorfo que no tiene una estructura interna regular de este tipo. Se puede examinar si un sólido es o no un cristal mediante un procedimiento cristalográfico conocido (tal como la medición de difracción de rayos X en polvo o el análisis calorimétrico de exploración diferencial). Por ejemplo, un sólido se somete a medición de difracción de rayos X en polvo usando rayos X obtenidos por irradiación con radiación $K\alpha$ de cobre. Se determina que el sólido es un cristal cuando se observan picos distintos en el patrón de difracción de rayos X, mientras que se determina que el sólido es amorfo cuando no se observan picos distintos. Se determina que el sólido es un cristal cuya cristalinidad es baja cuando los picos se pueden leer pero no son distintos (por ejemplo, anchos), y tal cristal cuya cristalinidad es baja está también englobado dentro del cristal producido por la presente invención.

El cristal producido por la presente invención puede formar a veces un hidrato al permitir que el cristal permanezca en el aire para absorber agua, lo cual indica que se ha agregado agua, o calentando el cristal a de 25 a 150 °C en las condiciones atmosféricas habituales, etc. Además, el cristal de la presente invención puede contener a veces un disolvente usado en el momento de la cristalización como un disolvente residual unido o un solvato.

En esta descripción, el cristal producido por la presente invención se representa sobre la base de datos de difracción de rayos X en polvo. En la difracción de rayos X en polvo, la medición y el análisis se pueden realizar con procedimientos convencionalmente usados en este campo, y por ejemplo, la difracción de rayos X en polvo se puede realizar usando el procedimiento descrito en los Ejemplos. Además, en general, en el caso de un cristal hidratado o deshidratado, la constante de red del mismo se cambia por la adición o eliminación de agua de cristalización y, por lo tanto, el ángulo de difracción (2θ) en la difracción de rayos X en polvo a veces se puede cambiar. Además, la intensidad del pico a veces se puede cambiar debido a una diferencia en una superficie de crecimiento de cristal o similares (hábito cristalino), etc. Por lo tanto, un cristal que tiene un ángulo de difracción de pico y un patrón de difracción de rayos X idéntico en la difracción de rayos X en polvo, así como también los cristales hidratados y deshidratados obtenidos a partir del cristal, están abarcados dentro del alcance de la presente invención.

En la medición de difracción en polvo usando una radiación $K\alpha$ de cobre, generalmente, una muestra es irradiada con radiación $K\alpha$ de cobre (en la que no se separan las radiaciones $K\alpha_1$ y $K\alpha_2$). Puede obtenerse un patrón de difracción de rayos X analizando la difracción derivada de la radiación $K\alpha$ y también puede obtenerse analizando únicamente la difracción derivada de la radiación $K\alpha_1$ obtenida de la difracción derivada de la radiación $K\alpha$. En la presente invención, el patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido por irradiación con radiación $K\alpha$ incluye un patrón de difracción de rayos X obtenido analizando picos de difracción derivados de la radiación $K\alpha$ y un patrón de difracción de rayos X obtenido analizando la difracción derivada de $K\alpha_1$, y es preferentemente un patrón de difracción de rayos X obtenido analizando la difracción derivada de la radiación $K\alpha_1$.

El cristal producido por la presente invención es un cristal de (2-cloro-4-fluorofenil){[(2R,3R,8R)-7-(etoxicarbonil)-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-en-8-il]sulfonil}azanida de potasio denominado Compuesto (1). El cristal del Compuesto (1) tiene el patrón de difracción de rayos X mostrado en la Fig. 1 en un patrón de difracción en polvo obtenido por irradiación con radiación $K\alpha$ de cobre. Además, el cristal del Compuesto (1) tiene picos característicos en los ángulos de difracción 2θ (°) de 3,82, 7,64, 11,48, 19,06, 23,08, 25,22 y 26,98. En este caso, el "pico característico" se refiere a un pico que tiene una intensidad relativa de 9 o más cuando la intensidad máxima de pico en la difracción de rayos X en polvo es de 100.

En el patrón de difracción de rayos X en polvo mostrado en la Fig. 1, la ordenada indica la intensidad de difracción [recuentos/s (cps)], y la abscisa indica el ángulo de difracción 2θ (°). El ángulo 2θ puede ser ligeramente cambiado en su posición e intensidad relativa dependiendo de las condiciones de medición y similares, por lo tanto, incluso cuando 2θ está ligeramente cambiado, la identificación de la forma cristalina debe determinarse apropiadamente según la referencia al patrón de todo el espectro. El límite de tal error está generalmente dentro del intervalo de ± 2 , preferentemente dentro del intervalo de ± 1 , más preferentemente dentro del intervalo de $\pm 0,5$, incluso más preferentemente dentro del intervalo de $\pm 0,2$.

Además, como es bien conocido en el campo de la cristalografía, las intensidades de los respectivos picos de difracción también pueden cambiarse por diversos factores (incluyendo la orientación preferida que se da en una forma cristalina específica y el efecto de tamaño de grano) y, por lo tanto, las intensidades relativas de los picos principales descritos anteriormente para identificar el cristal de la presente invención también pueden cambiarse y estos cristales están también englobados dentro del cristal de la presente invención.

El Compuesto (1) producido por la presente invención tiene actividad para suprimir la producción de un mediador inflamatorio causada por transducción de señales intracelulares o activación celular inducida por endotoxina, y posee asimismo una excelente estabilidad en almacenamiento y manipulación, y por lo tanto es útil como producto farmacéutico. Además, tal producto farmacéutico se usa preferentemente para animales de sangre caliente, más preferentemente para seres humanos.

En el caso en que se usa el Compuesto (1) como un agente terapéutico o un agente profiláctico para las enfermedades descritas anteriormente, el compuesto *per se* o como una mezcla con un excipiente, diluyente o

similares farmacológicamente aceptable apropiado, se puede administrar por vía oral en forma de un comprimido, una cápsula, un gránulo, un polvo, un jarabe o similares o por vía parenteral en forma de una inyección, un supositorio o similares.

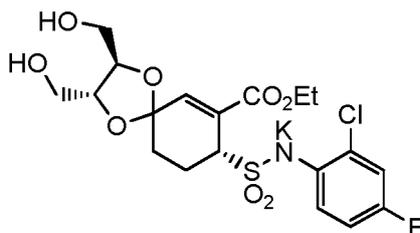
Estas preparaciones farmacéuticas se preparan de acuerdo con procedimientos conocidos usando aditivos tales como un excipiente (por ejemplo, se puede usar un excipiente orgánico tal como un derivado de azúcar tal como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol o sorbitol; un derivado de almidón, tal como almidón de maíz, almidón de patata, almidón pregelatinizado o dextrina; un derivado de celulosa, tal como celulosa cristalina; goma arábiga; dextrano; o pululano, o un excipiente inorgánico, tal como un derivado de silicato tal como anhídrido silícico ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio o aluminometasilicato de magnesio; un fosfato, tal como hidrogeno fosfato cálcico; un carbonato, tal como carbonato cálcico; o un sulfato, tal como sulfato cálcico), un lubricante (por ejemplo, se puede usar ácido esteárico, una sal metálica de ácido esteárico tal como estearato de calcio o estearato de magnesio; talco; una cera tal como cera de abejas o espermaceti; ácido bórico; ácido adípico; un sulfato tal como sulfato sódico; glicol; ácido fumárico; benzoato sódico; D- o L-leucina; un laurilsulfato tal como laurilsulfato de sodio o laurilsulfato de magnesio; un ácido silícico tal como anhídrido silícico o silicato hidratado; o cualquiera de los derivados de almidón anteriormente descritos), un aglutinante (por ejemplo, se puede usar hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol o un compuesto similar a cualquiera de los excipientes descritos anteriormente), un disgregante (por ejemplo, se puede usar un derivado de celulosa tal como hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio o carboximetilcelulosa sódica reticulada internamente; un polímero soluble en agua químicamente modificado como carboximetilalmidón, carboximetilalmidón sódico o polivinilpirrolidona reticulada; o cualquiera de los derivados de almidón descritos anteriormente), un emulsionante (por ejemplo, se puede usar una arcilla coloidal como bentonita o veegum, un hidróxido metálico como hidróxido de magnesio o hidróxido de aluminio; un tensioactivo aniónico como laurilsulfato de sodio o estearato cálcico; un tensioactivo catiónico tal como cloruro de benzalconio; o un tensioactivo no iónico, como un éter alquílico de polioxietileno, un éster de ácido graso de polioxietilensorbitán o un éster de ácido graso de sacarosa), un estabilizante (por ejemplo, se puede usar un éster de ácido paraoxibenzoico, como metilparabeno o propilparabeno; un alcohol como clorobutanol, alcohol bencilico o alcohol feniletílico; cloruro de benzalconio; un fenol tal como fenol o cresol; timerosal; ácido deshidroacético; o ácido sórbico) y un corrector (por ejemplo, se puede usar un edulcorante, acidificante, aroma o similares, de uso común) o un diluyente.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle haciendo referencia a los Ejemplos y a los Ejemplos de Ensayo.

(Ejemplo 1)

(2-cloro-4-fluorofenil){[(2R,3R,8R)-7-(etoxicarbonil)-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-en-8-il]sulfonil}azanida de potasio



100 mg (0,208 mmoles) de (2R,3R,8R)-8-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil]-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-eno-7-carboxilato de etilo [un compuesto descrito como un compuesto de baja polaridad (primer pico) del Ejemplo 162 en el documento WO 2007/032362] se disolvió en 1 ml de acetato de etilo y 2 ml de una solución que contenía 38 mg (0,208 mmoles) de 2-etilhexanoato de potasio hidrato en acetato de etilo se añadieron a esto con agitación a temperatura ambiente. La solución de reacción resultante se concentró a presión reducida y al residuo se le añadió éter dietílico. Se obtuvo un sólido precipitado por filtración y se lavó con éter dietílico, con lo que se obtuvieron 92 mg de un producto en bruto en forma de un sólido amorfo. A continuación, el producto en bruto se disolvió en acetato de etilo y la solución resultante se calentó a reflujo a 130 °C durante 2 horas. Después de enfriar la mezcla resultante, se obtuvo un sólido precipitado por filtración y se lavó con acetato de etilo, con lo que se obtuvo el compuesto del título en forma de un cristal blanco.

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm:

7,40 (1H, dd, J = 9 Hz, 6 Hz), 7,07-6,97 (1H, m), 6,84-6,75 (1H, m), 6,46 (1H, s), 4,98 (1H, t, J = 6 Hz), 4,82 (1H, t, J = 6Hz), 4,11-4,02 (1H, m), 4,02-3,93 (1H, m), 3,93-3,80 (3H, m), 3,63-3,41 (4H, m), 2,78-2,65 (1H, m), 2,34-2,25 (1H, m), 1,87-1,74 (1H, m), 1,65-1,58 (1H, m), 1,14 (3H, t, J = 7 Hz)

El patrón de difracción de rayos X en polvo se muestra en la Fig. 1.

<Otro Procedimiento>

Se disolvieron 300 mg (0,625 mmoles) de (2R,3R,8R)-8-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil]-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-eno-7-carboxilato de etilo en 2 ml de acetato de etilo y 4 ml de una solución que contenía 114 mg (0,625 mmoles) de 2-etilhexanoato de potasio hidrato en acetato de etilo se añadieron con agitación a temperatura ambiente. La solución de reacción resultante se concentró a presión reducida y al residuo se le añadió éter dietílico. Se obtuvo un sólido precipitado por filtración y se lavó con éter dietílico, con lo que se obtuvo un producto en bruto en forma de un sólido amorfo. Después, el producto en bruto se disolvió en 3 ml de acetato de etilo y a esto se añadió un germen cristalino obtenido por el procedimiento descrito anteriormente y la mezcla resultante se calentó a reflujo a 100 °C durante 5 minutos. Después de enfriar la mezcla resultante, se obtuvo un sólido precipitado por filtración y se lavó con acetato de etilo, con lo que se obtuvieron 236 mg del compuesto del título en forma de un cristal blanco (rendimiento: 73 %).

(Ejemplo 3)**Medición de Difracción de rayos X en Polvo**

Se usó un Rint TTR-III (provisto de un tubo contador de centelleo y una ranura larga para eliminar las radiaciones K_{β}) fabricado por Rigaku Corporation. Se colocó una muestra uniformemente sobre un portamuestras no reflectante y se realizó la medición en las siguientes condiciones:

<Condiciones analíticas>

Tipos de rayos X: Cu-K α (longitud de onda: 1,54 Å), tensión del tubo: 50 kV, corriente del tubo: 300 mA, velocidad de escaneo: 2°/min, paso: 0,02°, alcance del escaneo (2 θ): 2° a 60°, ranura de divergencia: 0,5 mm, ranura de dispersión: 0,5 mm, ranura de recepción: 0,5 mm

<Resultados de la medición>

En la Fig. 1 se muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido midiendo el cristal del compuesto obtenido en el Ejemplo 1 de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. En la Tabla 1 se muestran picos que tienen una intensidad relativa de 9 o más cuando la intensidad máxima de pico en la Fig. 1 es de 100.

[Tabla 1]

| 2 θ | valor d | Intensidad relativa |
|------------|---------|---------------------|
| 3,82 | 23,11 | 24 |
| 7,64 | 11,56 | 100 |
| 11,48 | 7,70 | 9 |
| 19,06 | 4,65 | 12 |
| 23,08 | 3,85 | 12 |
| 25,22 | 3,53 | 9 |
| 26,98 | 3,30 | 30 |

(Ejemplo 4) Prueba de Absorción de Humedad

Se pesó una muestra en un vaso de muestra de vidrio y se midió su peso en las siguientes condiciones.

<Condiciones de medición>

Dispositivo de medición: DVS Advantage, fabricado por Surface Measurement System Ltd.

Medición de la humedad: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 50, 40, 30, 25, 20 y 10 % de HR

Medición de la temperatura: 25 °C, tiempo de exposición mínimo: 15 min, tiempo de exposición máximo: 120 min, condición de transición de paso: dentro de 0,006 % en peso

Se confirmó la apariencia de la muestra en el momento de la finalización de la medición.

<Resultados de la Medición>

Como se muestra en la Tabla 4 y en las Figs. 3 y 4, el (2R,3R,8R)-8-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil]-2,3-

bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-eno-7-carboxilato de etilo (un compuesto en forma libre descrito como un compuesto de baja polaridad (primer pico) del Ejemplo 162 en el documento WO 2007/032362) usado como compuesto del ejemplo comparativo mostró alta higroscopicidad a cada medida de humedad (véase la Fig. 3), sin embargo, el compuesto del ejemplo 1 no mostró higroscopicidad (véase la Fig. 4). En particular, el compuesto del Ejemplo 1 no mostró higroscopicidad ante ninguna medida de humedad de manera consistente (véase la Fig. 4).

(Ejemplo 5) Ensayo de solubilidad

<Procedimiento de ensayo>

150 mg del compuesto del Ejemplo 1 y del Ejemplo Comparativo 1 fueron disueltos en 5 ml de una solución acuosa de fosfato que contenía cloruro de sodio (conteniendo NaCl 150 mM y NaH₂PO₃·2H₂O 10 mM). Después de agitar la mezcla resultante durante 30 minutos mientras se medía el pH de la mezcla, una porción de 0,5 ml de la suspensión resultante se tomó y filtró mediante un filtro de jeringa. Una porción de 100 µl del filtrado obtenido se transfirió a un matraz aforado de 10 ml y se diluyó a 10 ml con una solución acuosa de 50 % de MeCN, con lo que se preparó una solución de muestra. A la suspensión se añadió gota a gota HCl concentrado para ajustar su pH a aproximadamente 7,5.

La medición se realizó usando HPLC en siguientes condiciones.

<Condiciones del Procedimiento Analítico>

Sistema HPLC: Water's Alliance

Columna: XTerra MS C18 3,5 µm, Medidas de la Columna: 4,6 x 100 mm

Temperatura de la columna: 40 °C, Caudal: 1,2 ml/min

Disolvente A: 0,1 % de ácido fosfórico en agua, Disolvente B: 0,1 % ácido fosfórico en MeCN

Tabla de gradiente:

[Tabla 3]

| Tiempo | Flujo total | % de A | % de B | Curva |
|--------|-------------|--------|--------|-------|
| 0 | 1,2 | 95 | 5 | |
| 15 | 1,2 | 5 | 95 | 6 |
| 15,01 | 1,2 | 95 | 5 | 11 |
| 20 | 1,2 | 95 | 5 | 6 |

25 <Resultados de las Mediciones>

Como se muestra en la Tabla 4, el compuesto (en la forma libre) del Ejemplo Comparativo tenía baja solubilidad. Mientras tanto, el compuesto del Ejemplo 1 mostró una solubilidad de 13,8 mg/ml y 9,6 mg/ml, respectivamente.

(Ejemplo 6) Ensayo de estabilidad de la solución

<Procedimiento de ensayo>

Cada uno de los compuestos (Ejemplo 1 y Ejemplo Comparativo) se pesó con precisión y se colocó en un matraz aforado de 10 ml y se disolvió en PBS a pH 6. A continuación, se le añadió HCl 1 N para ajustar la solución del compuesto del Ejemplo 1 a pH 6 y la solución del compuesto del Ejemplo Comparativo a pH 8. Los matraces anteriores tal cual estaban y los matraces cubiertos con papel de aluminio para protegerlos de la luz como controles se colocaron en un probador de luz a 25 °C. Después de un día, cada solución se diluyó a 10 ml con 50 % de MeCN. La concentración de cada solución se calculó realizando HPLC en las mismas condiciones que se usaron en el ensayo de solubilidad descrito anteriormente, y se calculó el cambio en la concentración con respecto al control.

<Resultados de la Medición>

Como se muestra en la Tabla 4, los valores para la estabilidad de la solución después del almacenamiento durante 1 día fueron de 99,4 % en el caso del compuesto (en la forma libre) del Ejemplo Comparativo, de 99,9 % en el caso del compuesto del Ejemplo 1.

(Ejemplo 7) Evaluación para la estabilidad química

<Procedimiento de ensayo>

5 En una habitación con baja humedad (25 °C, 30 % de HR) se pesó una muestra con precisión en una taza de muestra de cuarzo y se colocó en un matraz aforado de 10 ml. A continuación, el matraz se dejó en un desecador que contenía gel de sílice durante 3 días, manteniendo abierta la boca del matraz. Después, el matraz se almacenó de forma adicional en un entorno a una temperatura de 25 °C y una humedad del 30 % durante 4 semanas mientras se seguía manteniendo abierta la boca del matraz. A continuación, la cantidad residual se midió mediante el uso de HPLC en las mismas condiciones que se usaron en el ensayo de solubilidad en el Ejemplo 5.

<Resultados de la Medición>

10 Como se muestra en la Tabla 4, fue imposible realizar este ensayo para el compuesto (en la forma libre) del Ejemplo Comparativo porque el compuesto es higroscópico, sin embargo, el compuesto del Ejemplo 1 mostró una cantidad residual de 98,9 %, lo que reveló que el Compuesto del Ejemplo 1 es estable.

[Tabla 4]

| | Ejemplo comparativo | Ejemplo 1 |
|---|---|--|
| Forma libre o sal de potasio | Forma libre | Sal de potasio |
| Forma cristalina | Amorfo | Cristalino |
| Higroscopicidad | Con higroscopicidad 2,6 % (humedad relativa 10→ 80 %) cambiado a forma de tipo caramelo | Sin higroscopicidad < 0,1 % (humedad relativa 10→ 80 %) no hay cambios de apariencia |
| Solubilidad (PBS pH 7,5) | Dado que el compuesto se transforma en un sólido viscoso en una solución acuosa, fue imposible medir la concentración de una manera reproducible. | 13,8 mg/ml |
| Estabilidad de la solución (25 °C, 1 día) | 99,4 % tampón McIlvaine pH 8 | 99,9 % PBS pH 6 |
| Estabilidad química (25 °C, 4 semanas) | Debido a la alta higroscopicidad, fue imposible realizar esta prueba. | 98,9 % (humedad relativa 30 %) |

15 **(Ejemplo Prueba 1) Efecto Supresor sobre la Producción de TNF- α en células estimuladas con endotoxina (*in vitro*)**

20 Para el compuesto de la presente invención se determinó la tasa de supresión de la producción de TNF- α cuando la línea de células monocíticas humanas U937 se estimuló con endotoxina. Específicamente, a un medio RPMI-1640 que contiene 10 % (% en volumen) de suero bovino de recién nacido inactivado se añadió 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato para dar una concentración final de 30 ng/ml. Las células U937 se suspendieron en el medio y se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos (Sumilon) de manera que el número de células por pocillo/volumen fue de $2 \times 3 \times 10^4/0,1$ ml y la placa de cultivo se incubó a continuación durante 3 días a 37 °C en un incubador de dióxido de carbono con un 5 % de CO₂ y un 100 % de humedad. Tras la finalización de la incubación se retiró el sobrenadante del cultivo. Se añadió el compuesto de la presente invención a cada pocillo a diferentes concentraciones y también se añadió lipopolisacárido (LPS) (E. coli 0111:B4, Sigma) para dar una concentración final de 30 ng/ml. Después de incubar nuevamente la placa de cultivo en el incubador de dióxido de carbono durante 4,5 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo. Usando una placa negra de media área de 384 pocillos (Greiner) y un kit de determinación cuantitativa HTRF fabricado por Cisbio International, la concentración de TNF- α en el sobrenadante del cultivo se midió como fluorescencia resuelta en el tiempo por Discovery (Packard). A partir del valor medido en ausencia de LPS (X), el valor medido en ausencia del compuesto de la presente invención (Y) y el valor medido en presencia del compuesto de la presente invención (Z), la tasa de supresión de la producción de TNF- α se obtuvo según la siguiente fórmula de cálculo [1].

$$\text{Tasa de supresión de producción de TNF-}\alpha \text{ (\%)} = \{1 - (Z-X) / (Y-X)\} \times 100 \quad [\text{I}]$$

<Efecto supresor sobre la Producción de TNF- α (in vitro)>

[Tabla 5]

| < Efecto Supresor sobre la Producción de TNF- α (in vitro)> | |
|--|---|
| Compuesto de ensayo | Alcance de supresión de producción of TNF- α [%] (concentración del compuesto de ensayo: 100 nM) |
| Compuesto del Ejemplo 1 | 89 |

5 Como se muestra en la Tabla 5, en este ensayo el compuesto de la presente invención mostró un efecto supresor excelente sobre la producción de TNF- α en células estimuladas con endotoxina.

(Ejemplo de ensayo 2) Efecto Supresor sobre Aumento del nivel en Sangre de TNF- α (in vivo)

10 Se estudió el efecto supresor del compuesto de la presente invención sobre la elevación del nivel en sangre de TNF- α . Se realizó un ensayo para la elevación del nivel de TNF- α en sangre de acuerdo con el procedimiento de Parant y col. descrito en Journal of Leukocyte Biology, vol. 47, página 164 (1990).

En ensayo se usaron de 3 a 4 ratas macho Sprague Dawley (8 a 9 semanas de edad) para cada grupo.

15 Cuatro horas antes de la administración de LPS, se administró dipéptido de muramilo disuelto en solución salina fisiológica (1 mg/ml) a cada rata a través de la vena de la cola en una dosis de 1 ml/kg. 0,5 horas antes de la administración de LPS, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (40 mg/kg) y se administró a cada rata a través de la vena femoral derecha, en una dosis de 1 ml/kg, el compuesto de la presente invención disuelto en una solución de 5 % de dimetilacetamida/95 % de polietilenglicol 400. Al grupo de control se le administró una solución de 5 % de dimetilacetamida/95 % de polietilenglicol 400 a una dosis de 1 ml/kg. Se administró LPS disuelto en solución salina fisiológica (3 μ g/ml) a cada rata a través de la vena femoral izquierda a una dosis de 1 ml/kg. 2 horas después de la administración de LPS se recogió la sangre usando una solución de citrato sódico al 3,8 % (p/v) como anticoagulante y el plasma sanguíneo se separó por centrifugación (10.000 g, 5 minutos, 4 °C). El nivel plasmático de TNF- α se determinó usando un kit de determinación cuantitativa de TNF- α (BioSource International, Inc.). A partir del nivel de TNF- α en sangre en el grupo de control (X) y del nivel de TNF- α en sangre en el grupo al que se había administrado el compuesto de la presente invención (Y) se calculó la tasa de supresión de la producción de TNF- α de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo [II].

$$25 \quad \text{Tasa de supresión de producción de TNF-}\alpha \text{ (\%)} = \{1-Y/X\} \times 100 \quad [\text{II}]$$

< Efecto Supresor sobre la Producción de TNF- α (in vivo)>

[Tabla 6]

| < Efecto Supresor sobre la Producción de TNF- α (in vivo)> | |
|---|--|
| Compuesto de ensayo | Tasa de supresión de la producción de TNF- α [%] (concentración del compuesto de ensayo: 0,3 mg/kg) |
| Compuesto del Ejemplo 1 | 96 |

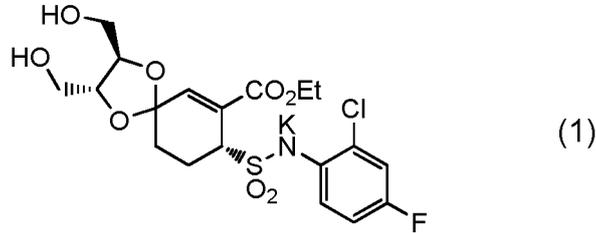
30 Como se muestra en la Tabla 6, en este ensayo, el compuesto producido por la presente invención mostró un excelente efecto supresor sobre la elevación del nivel de TNF- α en sangre.

Aplicabilidad Industrial

35 De acuerdo con la presente invención se pueden obtener cristales de derivados de cicloalqueno sustituidos que tienen una excelente estabilidad en almacenamiento y manipulación. Las sales de potasio de los derivados de cicloalqueno sustituidos de la presente invención suprimen la producción de un mediador inflamatorio causada por la transducción de señales intracelulares o la activación celular inducida por endotoxina y, por tanto, son eficaces como un agente profiláctico y/o terapéutico para la septicemia.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un cristal de (2-cloro-4-fluorofenil){[(2R,3R,8R)-7-(etoxicarbonil)-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-en-8-il]sulfonil}azanida de potasio representado por la siguiente fórmula (1):



5

el cual muestra picos característicos en los ángulos de difracción 2θ (°) de 3,82, 7,64, 11,48, 19,06, 23,08, 25,22 y 26,98 (± 2 , respectivamente), en difracción de rayos X en polvo obtenida por irradiación con radiación $K\alpha$ de cobre, **caracterizado por** la adición de una solución de 2-etilhexanoato de potasio hidrato en acetato de etilo gota a gota a una solución o suspensión de (2R,3R,8R)-8-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil]-2,3-bis(hidroximetil)-1,4-dioxaspiro[4.5]deca-6-eno-7-carboxilato de etilo, disolviendo en acetato de etilo, calentando a reflujo y luego enfriando.

10

Fig. 1

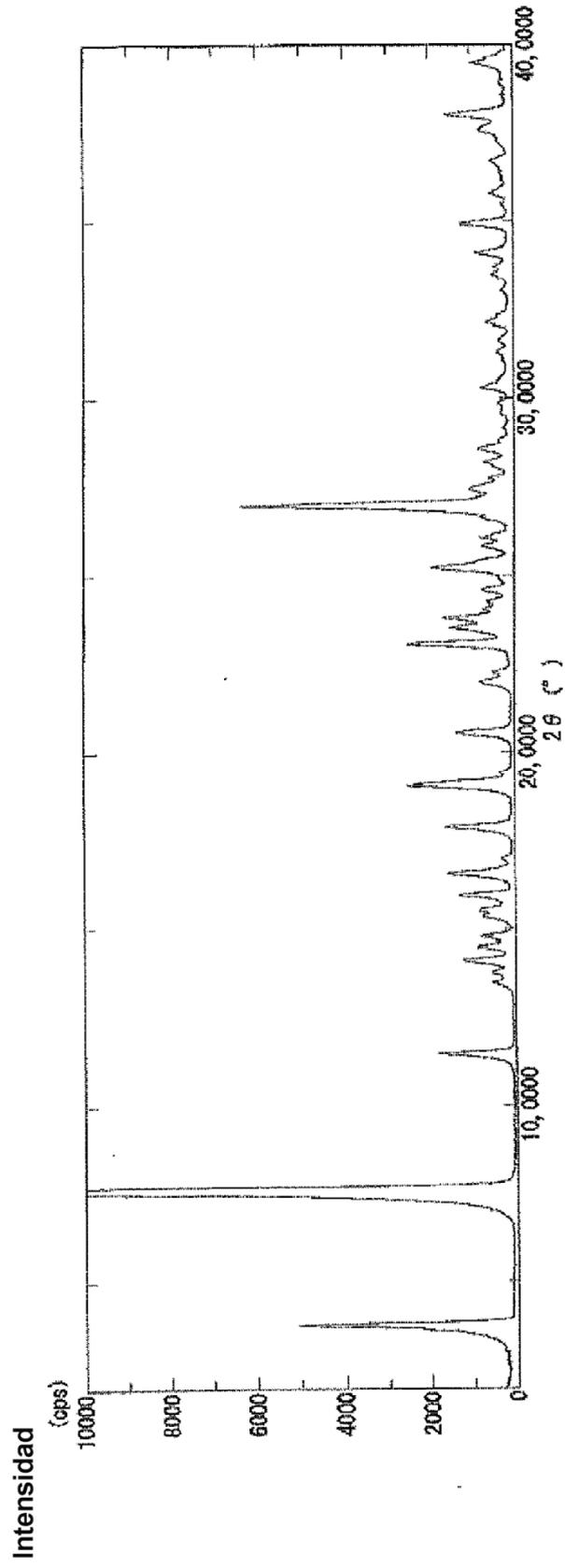


Fig. 3

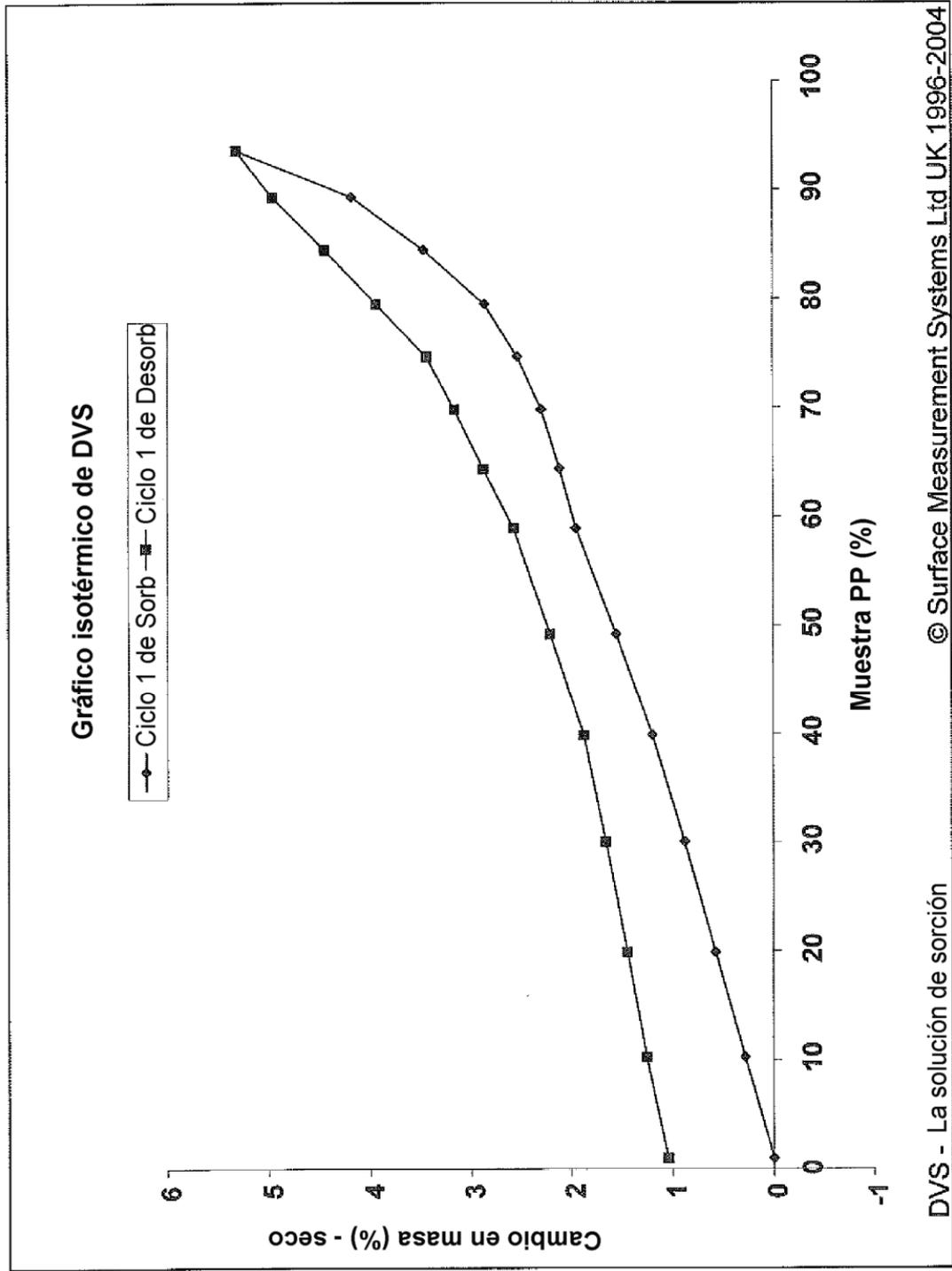


Fig. 4

