

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 218**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 15/252 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** E 14159462 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** EP 2778172

54 Título: **Monohidrato cristalino estable de clorhidrato de epirrubicina y método de producción**

30 Prioridad:

15.03.2013 EP 13159392

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**SYNBIAS PHARMA AG (100.0%)
Krepilshchikov Str. 181
83085 Donetsk, CH**

72 Inventor/es:

**ZABUDKIN, ALEXANDER;
MATVYEV, ALEXEY y
MATVIENKO, VICTOR**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 623 218 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

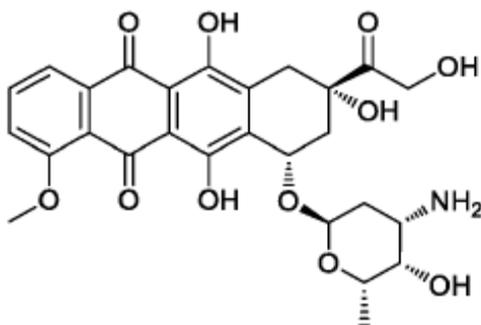
Monohidrato cristalino estable de clorhidrato de epirrubicina y método de producción

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un monohidrato cristalino estable de clorhidrato de epirrubicina (esto es, clorhidrato de 4'-epidoxorrubicina) y un método de producción correspondiente. Más particularmente, la invención está dirigida a un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina que tiene un contenido de agua de 2.7% a 3.5% (p/p), que carece de solventes residuales y que presenta una distribución de tamaño uniforme de las partículas cristalinas producidas.

Antecedentes de la invención

- 10 Las antraciclinas representan una clase de compuestos bioactivos de origen natural derivados del género bacteriano *Streptomyces*. Se demostró clínicamente que varias antraciclinas, incluyendo daunorrubicina, idarrubicina, doxorrubicina, epirrubicina y carminomicina, son agentes antineoplásicos eficaces que se pueden emplear para el tratamiento de un amplio intervalo de cánceres incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón y neoplasias malignas hematológicas tales como leucemias y linfomas. Además, también se demostró que los miembros de esta clase de compuestos eran útiles en trasplantes de médula ósea y durante el trasplante de células madre.
- 15 La epirrubicina es el 4-epímero de doxorrubicina y un derivado semisintético de daunorrubicina y representado por la siguiente fórmula:



- 20 Aunque los mecanismos precisos de sus propiedades citotóxicas aún no se han elucidado completamente, se cree que la epirrubicina forma complejos con ADN por intercalación de sus anillos planares entre los pares de bases de nucleótidos, con la consiguiente inhibición del ácido nucleico (ADN y ARN) y la síntesis de proteínas, desencadenando la escisión del ADN a través de la topoisomerasa II. La epirrubicina y sus sales de adición, tales como el clorhidrato de epirrubicina, se utilizan como un componente del tratamiento adyuvante del cáncer de mama.

- 25 Actualmente se conocen en la técnica diversos métodos para la producción de clorhidrato de epirrubicina. Sin embargo, el clorhidrato de epirrubicina amorfo (por ejemplo, preparado como se describe en la Patente de los Estados Unidos 4,861,870) se considera generalmente no apropiado para aplicaciones farmacéuticas debido a su higroscopia significativa e inestabilidad química durante el almacenamiento, con acumulación de la aglicona doxorrubicinona.

- 30 Algunos polimorfos cristalinos del clorhidrato de epirrubicina, que se caracterizan por patrones de difracción de rayos X particulares, han estado disponibles previamente y se describen, *inter alia*, en los documentos de patente: WO 2005/004805 A1; WO 2010/039159 A1; WO 2011/118929 A2; y WO 2012/163508 A1. Aunque los diversos patrones de difracción de rayos X muestran un alto grado de similitud, los métodos de producción correspondientes son considerablemente diversos. Especialmente, los esquemas de síntesis descritos en los dos documentos mencionados en primer lugar han sido posteriormente indicados como que no dan un resultado fiable de un producto cristalino (véase WO 2012/163508 A1; párrafos [0007] y [0069]), y en particular en ningún producto que tiene una distribución de tamaño de partícula uniforme, que se debe considerar como un aspecto clave para la aplicabilidad farmacéutica.

- 35 Los polimorfos cristalinos del clorhidrato de epirrubicina descritos en WO 2005/004805 A1 y WO 2010/039159 A1 (designados "tipo II") así como WO 2011/118929 A2 (designados "forma A" a "forma D") se ha demostrado que presentan cierta estabilidad térmica durante el almacenamiento de hasta seis meses.

- 40 Sin embargo, varios de los métodos de producción empleados en los documentos de patente anteriores implican el uso de cantidades significativas de solventes. Está bien establecido en la técnica que las antraciclinas forman solvatos (véase, por ejemplo, Courseille, C. et al. (1979) Acta Cryst. B35, 764-767). Se sabe que tales solvatos muestran una estabilidad térmica mejorada en comparación con el compuesto "puro" respectivo. Los esquemas de producción mencionados anteriormente no abordan el problema de la formación de solvatos. Por consiguiente, no es totalmente

evidente si la estabilidad térmica observada para los polimorfos del clorhidrato de epirrubicina anteriormente mencionados se puede asignar de hecho al compuesto (puro) *per se* o está influenciada por la formación de solvatos (esto es, la presencia de solventes residuales en el producto final).

5 Más allá, también es evidente que los solvatos son más difíciles de controlar por sus propiedades higroscópicas, ya que los solvatos tienen una tendencia aumentada a absorber agua. La presencia de solventes residuales (al menos en cantidades fácilmente detectables) también debería influir en la seguridad de los productos (véase, *inter alia*, la directriz Q3C (R5) de ICH [International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use]). Por ejemplo, la producción de formas cristalinas A, C y D de acuerdo con WO 10 2011/118929 A2 implica el uso de solventes de clase 2 (como se definen por ICH), tales como acetonitrilo y N,N-dimetilformamida, cuyo uso en los productos farmacéuticos debe ser limitado debido a su toxicidad inherente.

De este modo, todavía existe la necesidad de una forma cristalina de clorhidrato de epirrubicina que supere las limitaciones anteriores, en particular con respecto a la uniformidad del producto, la estabilidad del producto a largo plazo y la seguridad del producto.

15 En particular, sigue existiendo la necesidad de un compuesto que tenga una estabilidad térmica mejorada y una vida útil prolongada, al tiempo que presenta una capacidad higroscópica reducida (esto es, estabilidad frente al agua) y que esté virtualmente desprovisto de solventes residuales.

De acuerdo con lo anterior, un objeto de la presente invención es proporcionar tal forma cristalina de clorhidrato de epirrubicina, así como un método correspondiente para su producción.

Sumario de la invención

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina, que comprende: (a) adicionar al menos un primer solvente y al menos un segundo solvente al clorhidrato de epirrubicina, en donde (i) el primer solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, y mezclas de los mismos; (ii) el segundo solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-propanol, isopropanol, etanol, y mezclas de los mismos; y (iii) la relación de volumen del primer solvente al segundo solvente está 25 en el intervalo entre 1:1 y 2:1 (v/v) (b) ajustar en la solución obtenida en la etapa (a) el contenido de agua a una cantidad en el intervalo entre 8% y 11% (p/p); y (c) calentar la solución obtenida en la etapa (b) a una temperatura de 70°C a 90°C con el fin de permitir la cristalización; en donde el monohidrato cristalino producido tiene un contenido de agua en el intervalo entre 2.7% y 3.5% (p/p) y está desprovisto de solventes residuales.

Se prefiere particularmente que, el primer solvente sea 1-butanol y el segundo solvente sea 1-propanol.

30 En realizaciones particulares, el método comprende, además: calentar la mezcla de la etapa (a) a una temperatura de 40°C a 55°C hasta que se completa la disolución completa de la mezcla de reacción.

En otras realizaciones particulares, la concentración final de clorhidrato de epirrubicina en la solución de la etapa (b) está en el intervalo entre 10 g/L y 100 g/L.

En realizaciones preferidas, la solución en la etapa (c) se calienta a una temperatura de 75°C a 85°C.

35 En realizaciones específicas, el método comprende además la siembra de la solución obtenida en la etapa (b) con el fin de inducir la cristalización.

En otras realizaciones específicas, el método comprende además purificar los cristales obtenidos en la etapa (c).

En realizaciones preferidas, el contenido de agua del monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina producido está en el intervalo entre 2.8% y 3.3% (p/p).

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina producido por el método descrito en este documento anteriormente, en donde (i) el diámetro medio de las partículas de cristal producidas está en el intervalo entre 20 μm y 50 μm , y (ii) el tamaño de partícula de al menos 60%, y particularmente de al menos 80% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 20\%$.

45 En realizaciones preferidas, el tamaño de partícula de al menos 60%, y particularmente de al menos 80% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 10\%$.

50 En realizaciones particulares, el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina se caracteriza además por uno o ambos del grupo que consiste en un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos con ángulos medios de difracción (2θ) 5.1°, 9.1°, 13.6°, 22.1°, 22.5°, y 24.0° (cada uno $\pm 0.2^\circ$) y una termoestabilidad que da como resultado la producción de menos de 0.5% (p/p) de doxorubicinona después de la incubación a 100°C durante un mes de acuerdo con las directrices de ICH.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina como se ha descrito anteriormente en este documento para uso en la prevención y tratamiento del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

5 Las figuras 1-3 ilustran la caracterización funcional de un monohidrato cristalino de ejemplo de clorhidrato de epirrubicina de la presente invención, que se prepara de acuerdo con el ejemplo 1. La figura 1 muestra los resultados de un análisis de DSC representativo para determinar el punto de fusión; la figura 2 los resultados de un análisis termogravimétrico representativo para determinar el contenido de agua; y la figura 3 los resultados de un análisis de difracción de rayos X en polvo representativo.

10 Las figuras 4-6 ilustran la caracterización funcional de un monohidrato cristalino de ejemplo de clorhidrato de epirrubicina de la presente invención, que se prepara de acuerdo con el ejemplo 2. La figura 4 muestra los resultados de un análisis de DSC representativo para determinar el punto de fusión; la figura 5 los resultados de un análisis termogravimétrico representativo para determinar el contenido de agua; y la figura 6 los resultados de un análisis de difracción de rayos X en polvo representativo.

15 Las figuras 7-9 ilustran la caracterización funcional de un monohidrato cristalino de ejemplo de clorhidrato de epirrubicina de la presente invención, que se prepara de acuerdo con el ejemplo 3. La figura 7 muestra los resultados de un análisis de DSC representativo para determinar el punto de fusión; la figura 8 los resultados de un análisis termogravimétrico representativo para determinar el contenido de agua; y la figura 9 los resultados de un análisis de difracción de rayos X en polvo representativo.

20 La figura 10 ilustra un análisis termogravimétrico representativo para determinar el contenido de agua de un trihidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina, que se prepara de acuerdo con el ejemplo 3.

25 Las figuras 11-13 ilustran las distribuciones del tamaño de partícula de diferentes muestras de clorhidratos cristalinos de epirrubicina, según se determinó por análisis de difracción láser utilizando un analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). La figura 11 muestra los resultados de un análisis representativo utilizando un clorhidrato de epirrubicina cristalino que se prepara de acuerdo con el ejemplo 1 del Documento de Patente WO 2012/163508 A1; la figura 12 los resultados de un análisis representativo utilizando un clorhidrato de epirrubicina cristalino que se prepara de acuerdo con el ejemplo 2 del Documento de Patente WO 2012/163508 A1; y la figura 13 los resultados de un análisis representativo utilizando un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere al hallazgo inesperado de que la provisión de clorhidrato de epirrubicina en forma de un monohidrato cristalino que tiene un contenido de agua en el intervalo entre el 2.7% y el 3.5% (p/p) combina una estabilidad térmica mejorada y una longitud con la provisión de un producto altamente uniforme, propiedades higroscópicas ventajosas, así como un producto superior seguro (debido a la ausencia de solventes residuales). El ajuste del contenido de agua de la mezcla de solventes antes de la cristalización hasta una cantidad en el intervalo entre 35 8% y 11% (p/p) en combinación con una temperatura de cristalización comparativamente alta y una combinación específica de solventes, como se especifica en la reivindicación 1, se ha encontrado que es una característica técnica típica en la obtención del monohidrato cristalino.

40 Sin la intención de estar limitado por una teoría particular, se considera que la presencia de una cierta cantidad de agua residual en el polimorfo cristalino interfiere con la incorporación de moléculas de solvente en la estructura cristalina y/o las desplaza de la estructura cristalina sin tener cualquier efecto adverso significativo sobre la estabilidad de los cristales contra el calor o el agua, siendo este último efecto particularmente sorprendente.

45 Especialmente, cuando se prepara clorhidrato de epirrubicina en forma de un trihidrato aumentando la cantidad de agua presente en la mezcla de solventes, las propiedades superiores identificadas para la forma de monohidrato ya no se observaron. En particular, la forma de trihidrato es considerablemente menos estable contra el calor y el agua que la forma de monohidrato. De acuerdo con lo anterior, las propiedades superiores están específicamente asociadas con la forma monohidrato de clorhidrato de epirrubicina. La presente invención se describirá a continuación con respecto a realizaciones particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención se debe entender como no limitada a la misma, sino sólo por las reivindicaciones adjuntas. Los dibujos descritos son sólo esquemáticos y se deben considerar no limitantes.

50 Cuando se utiliza el término "que comprende" en la presente descripción y en las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Para los fines de la presente invención, se considera que el término "que consiste en" es una realización preferida del término "que comprende". Si a continuación se define un grupo como comprendiendo al menos un cierto número de realizaciones, esto también se debe entender para describir un grupo, que preferiblemente consiste únicamente en estas realizaciones.

Cuando se utiliza un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un nombre singular, por ejemplo, "un", "una" o "el", esto incluye un plural de ese sustantivo a menos que se especifique lo contrario.

5 En el caso de que se indiquen valores numéricos en el contexto de la presente invención, el experto entenderá que el efecto técnico de la característica en cuestión se asegura dentro de un intervalo de precisión que por lo general abarca una desviación del valor numérico dado de $\pm 10\%$, y preferiblemente de $\pm 5\%$.

10 Además, los términos primero, segundo, tercero, (a), (b), (c), y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir una secuencia u orden cronológico. Se debe entender que los términos usados son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en este documento son capaces de funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en este documento.

Otras definiciones del término se darán en lo siguiente en el contexto del cual se utilizan los términos. Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar a la comprensión de la invención. Estas definiciones no se deben interpretar que tienen un alcance menor que el comprendido por un experto en la técnica.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina, que comprende:

(a) adicionar al menos un primer solvente y al menos un segundo solvente al clorhidrato de epirrubicina, en donde

(i) el primer solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, y mezclas de los mismos;

20 (ii) el segundo solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-propanol, isopropanol, etanol, y mezclas de los mismos; y

(iii) la relación de volumen del primer solvente al segundo solvente está en el intervalo entre 1:1 y 2:1 (v/v);

(b) ajustar en la solución obtenida en la etapa (a) el contenido de agua a una cantidad en el intervalo entre 8% y 11% (p/p); y

25 (c) calentar la solución obtenida en la etapa (b) a una temperatura de 70°C a 90°C con el fin de permitir la cristalización; en donde el monohidrato cristalino producido tiene un contenido de agua en el intervalo entre 2.7% y 3.5% (p/p) y está desprovisto de solventes residuales.

30 Para producir el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina, el compuesto se mezcla con al menos un primer solvente y al menos un segundo solvente. El compuesto de partida clorhidrato de epirrubicina se puede proporcionar como un sólido, en forma amorfa o en cualquier forma cristalina. Alternativamente, el clorhidrato de epirrubicina se puede proporcionar en forma de una solución o una suspensión, tal como una solución acuosa. El compuesto se puede producir por síntesis química o por fermentación o está comercialmente disponible de diversos proveedores.

35 Por lo general, el clorhidrato de epirrubicina se proporciona como un sólido y luego se disuelve en agua, por ejemplo, en una concentración en el intervalo entre 10 g/L y 100 g/L. El valor de pH de esta solución puede estar en el intervalo entre 3.0 y 5.0, preferiblemente entre 3.5 y 4.5. En realizaciones particulares, el agua se retira entonces hasta que se alcanza un estado de gel de la solución. Por ejemplo, la eliminación del agua se puede llevar a cabo por evaporación (por ejemplo, utilizando un evaporador giratorio) a baja presión y a una temperatura de 30°C a 45°C, preferiblemente a una temperatura de 35°C a 40°C.

40 El "al menos primer solvente", como se define en este documento, es un alcohol C₄ lineal o ramificado, es decir, un alcohol que tiene cuatro átomos de carbono, que se selecciona del grupo que consiste en 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol y mezclas de los mismos (tales como (1-butanol e isobutanol) o (1-butanol, isobutanol y tert-butanol)).

45 El "al menos un segundo solvente", como se define en este documento, es un alcohol de C₂ a C₃ lineal o ramificado, es decir, un alcohol que tiene dos o tres átomos de carbono, que se selecciona del grupo que consiste en etanol, 1-propanol, isopropanol y mezclas de los mismos (tales como (etanol y 1-propanol) o (1-propanol e isopropanol) o (etanol, 1-propanol e isopropanol)).

En realizaciones específicas, el al menos primer solvente puede ser 1-butanol y el segundo solvente etanol. O, el al menos primer solvente puede ser tert-butanol y el al menos segundo solvente es una mezcla de 1-propanol y etanol.

En realizaciones particulares, el primer solvente es 1-butanol y el segundo solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-propanol, isopropanol, etanol y mezclas de los mismos. En otras realizaciones particulares, el primer

ES 2 623 218 T3

solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol y mezclas de los mismos, y el segundo solvente es 1-propanol.

En realizaciones particularmente preferidas, el primer solvente es 1-butanol y el segundo solvente es 1-propanol.

- 5 En realizaciones específicas, el clorhidrato de epirrubicina se puede mezclar con al menos un tercer o al menos un cuarto solvente, en donde al menos el tercer o al menos el cuarto solvente se seleccionan entre alcoholes C₁ a C₁₀ lineales o ramificados, y particularmente de alcoholes C₁ a C₆ lineales o ramificados.

El al menos primer solvente y el al menos segundo solvente se pueden adicionar al clorhidrato de epirrubicina simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Por lo general, el al menos primer solvente y el al menos segundo solvente se adicionan secuencialmente, comenzando con el al menos primer solvente.

- 10 En realizaciones particulares, después de la adición del al menos primer solvente, se elimina el agua que está presente en la mezcla (tan completo como sea posible) hasta que se forma un precipitado sólido.

La eliminación del agua se puede llevar a cabo por evaporación (por ejemplo, utilizando un evaporador giratorio) a baja presión y a una temperatura de 30°C a 45°C, preferiblemente a una temperatura de 35°C a 40°C.

- 15 Después de la adición del al menos segundo solvente (ya sea simultánea o secuencialmente), la mezcla resultante se incuba por lo general, opcionalmente a una temperatura elevada, hasta que se logra la disolución completa, es decir, cualquiera de los sólidos precipitados que se presentan se han disuelto. Con este fin, la mezcla se puede calentar (preferiblemente bajo agitación) a una temperatura de 40°C a 55°C, preferiblemente a una temperatura de 45°C a 50°C.

En otras realizaciones particulares, la relación de volumen del primer solvente al segundo solvente está en el intervalo entre 1:1 y 2:1 (v/v). En realizaciones de ejemplo, esta relación de volumen es 1:1, 1.2:1, 1.4:1, 1.6:1, 1.8:1 o 2:1 (v/v).

- 20 Posteriormente, el contenido de agua en la solución obtenida después de la adición del al menos primer solvente y el al menos segundo solvente se ajusta a una cantidad en el intervalo entre 8% y 11% (p/p). Este ajuste se puede conseguir mediante la adición de agua faltante o la eliminación del exceso de agua, por ejemplo, por evaporación (véase anteriormente). El contenido de agua se puede determinar mediante diversos métodos establecidos en la técnica, por ejemplo, mediante titulación de Karl-Fischer (Fischer, K. (1935) *Angew. Chem.* 48, 394-396), en donde se puede realizar una titulación coulométrica o volumétrica, o mediante análisis termogravimétrico (revisado, por ejemplo, en Coats, A.W. and Redfern, J.P. (1963) *Analyst* 88, 906-924).

En otras realizaciones preferidas del método, el contenido de agua en la solución se ajusta a una cantidad en el intervalo entre 8% y 10% (p/p) o entre 9% y 11% (p/p), por ejemplo 8.0%, 8.2%, 8.4%, 8.6%, 8.8%, 9.0%, 9.2%, 9.4%, 9.6%, 9.8%, 10.0%, 10.2%, 10.4%, 10.6%, 10.8% o 11.0% (p/p).

- 30 En realizaciones particulares, la concentración final de clorhidrato de epirrubicina en la solución obtenida después del ajuste del contenido de agua está en el intervalo entre 10 g/L y 100 g/L, por ejemplo 10 g/L, 20 g/L, 50 g/L, 80 g/L o 100 g/L. Sin embargo, también es posible utilizar soluciones que tienen una concentración más alta de clorhidrato de epirrubicina, por ejemplo, hasta 120 g/L, 150 g/L o 200 g/L.

- 35 El valor de pH de la solución obtenida después del ajuste del contenido de agua puede estar en el intervalo entre 2.5 y 6.0 o entre 3.0 y 5.5. En realizaciones preferidas, el valor de pH se ajusta a un valor en el intervalo entre 3.5 y 4.5, por ejemplo, hasta 4.0.

- 40 La solución obtenida (esto es, después de la adición del al menos primer solvente y el al menos segundo solvente a clorhidrato de epirrubicina y disolución completa) se calienta entonces a una temperatura de 70°C a 90°C con el fin de permitir la cristalización. Preferiblemente, la solución se calienta a una temperatura de 75°C a 85°C, o particularmente preferible a una temperatura de 78°C a 85°C o de 78°C a 82°C, por ejemplo 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C o 85°C. La mezcla se calienta preferiblemente bajo agitación.

La incubación a una temperatura de 70°C a 90°C se continúa hasta que se ha formado un precipitado sólido (esto es, cristales de clorhidrato de epirrubicina), por ejemplo, durante hasta 1 hora, durante hasta 2 horas, durante hasta 4 horas o durante hasta 6 horas. La agitación puede continuar durante la incubación.

- 45 En una realización específica, el método de la presente invención comprende:

(a) adicionar al menos un primer solvente y al menos un segundo solvente al clorhidrato de epirrubicina, en donde el primer solvente es 1-butanol y el segundo solvente es 1-propanol y el primer solvente y el segundo solvente se relación de un volumen en el intervalo entre 1:1 y 2:1 (v/v);

- 50 (b) ajustar en la solución obtenida en la etapa (a) el contenido de agua a una cantidad en el intervalo entre 8% y 11% (p/p); y

(c) calentar la solución obtenida en la etapa (b) a una temperatura de 75°C a 85°C con el fin de permitir la cristalización; en donde el monohidrato cristalino producido tiene un contenido de agua en el intervalo entre 2.8% y 3.3% (p/p) y está desprovisto de solventes residuales. Particularmente, el método comprende además una cualquiera o más de las siguientes etapas:

- 5 (i) calentar la mezcla de la etapa (a) a una temperatura de 45°C a 50°C hasta que se logra la disolución completa;
- (ii) ajustar el valor de pH en la etapa (b) a un valor en el intervalo entre 3.5 y 4.5; y
- (iii) continuar la incubación de la solución en la etapa (c) a una temperatura de 75°C a 85°C hasta que se ha formado un precipitado sólido.
- 10 En realizaciones específicas, el método comprende además la siembra de la solución obtenida después del ajuste del contenido de agua con el fin de inducir la cristalización. Es decir, se adicionan uno o más pequeños cristales de epirrubicina a la solución, a partir de la cual crecen cristales más grandes.
- En otras realizaciones específicas, el método comprende además purificar los cristales obtenidos durante la cristalización. Por lo general, dicha purificación implica la separación de los cristales de los otros componentes de la mezcla, que se consigue usualmente por filtración o destilación. Además, el proceso de purificación puede implicar una
- 15 etapa de lavado con una solución de lavado apropiada tal como un alcohol o una cetona.
- En realizaciones particulares de los métodos, el proceso de purificación opcional comprende un proceso de extracción de fluido utilizando un fluido supercrítico, es decir, una sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico, donde no existen fases líquidas y gaseosas distintas. Los fluidos supercríticos que se utilizarán en este documento incluyen, *inter alia*, óxido nitroso, propano, etileno, fluorocarbonos y dióxido de carbono, siendo preferido
- 20 este último. El proceso de extracción de fluido se puede realizar a una temperatura entre 25-55°C (por ejemplo, entre 40-45°C) y una presión entre 10-60 MPa (por ejemplo, entre 40-55 MPa) durante un período de 2-4 horas (por ejemplo, 3 horas) a una velocidad de flujo en el intervalo entre 200-2000 mL/min (por ejemplo, entre 500-1000 mL/min).
- Finalmente, los cristales se pueden secar de acuerdo con los protocolos establecidos, opcionalmente bajo vacío. Por ejemplo, los cristales obtenidos se pueden secar al aire a una temperatura de 30°C a 40°C.
- 25 La caracterización funcional de los cristales resultantes reveló que representan una forma monohidratada de clorhidrato de epirrubicina (esto es, una molécula de agua por molécula de clorhidrato de epirrubicina) que tiene un contenido de agua en el intervalo entre 2.7% y 3.5% (p/p). El contenido de agua se puede determinar como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, mediante titulación de Karl Fischer o mediante análisis termogravimétrico.
- 30 En las realizaciones preferidas del método, el contenido de agua del monohidrato cristalino del clorhidrato de epirrubicina está en el intervalo entre 2.8% y 3.3% (p/p), por ejemplo 2.8%, 2.9%, 3.0%, 3.1%, 3.2% o 3.3% (p/p).
- Además, la caracterización funcional del monohidrato cristalino del clorhidrato de epirrubicina producido demostró que el compuesto está desprovisto de solventes residuales. El término "desprovisto de", como se utiliza en este documento, se refiere a una cantidad de solventes residuales en los cristales que es menos del 0.5% (p/p), preferiblemente menos del 0.3% (p/p) y particularmente preferente menos del 0.25% (p/p). La cantidad de solventes residuales presentes en los
- 35 cristales se puede determinar utilizando diversos métodos establecidos, tales como cromatografía de gases.
- En otro aspecto, la presente invención se refiere a un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina que se produce por el método descrito anteriormente en este documento, que tiene un contenido de agua en el intervalo entre 2.7% y 3.5% (p/p), y que está desprovisto de solventes residuales, en donde
- (i) el diámetro medio de las partículas de cristal producidas está en el intervalo entre 20 µm y 50 µm; y
- 40 (ii) el tamaño de partícula de al menos 60%, y particularmente al menos 80% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 20\%$.
- En otras palabras, el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina producido por la presente invención se caracteriza por una distribución de tamaño uniforme de las partículas de cristal, es decir, no hay desviación significativa del tamaño de la gran mayoría de las partículas de cristal individuales presente en una preparación a partir de un
- 45 diámetro medio de partícula (por lo general calculado como valor medio ponderado en volumen). Por ejemplo, la distribución del tamaño de partícula se puede determinar por análisis de difracción láser que está bien establecida en la técnica (por ejemplo, descrita en European Pharmacopeia, 7th Edition (2010), 20931). Un análisis representativo utilizando un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina de la presente invención se muestra en la figura 13.
- En primer lugar, el diámetro medio de las partículas de cristal producidas por el método de la presente invención está en
- 50 el intervalo entre 20 µm y 50 µm, por ejemplo 22 µm, 25 µm, 28 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm o 45 µm.

5 En segundo lugar, el tamaño de partícula de al menos 60%, al menos 70%, y particularmente de al menos 80% o al menos 90% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 20\%$. Por ejemplo, si el diámetro medio de las partículas de cristal producidas es de 25 μm , entonces el porcentaje respectivo de las partículas de cristal presentes en una preparación dada tiene un diámetro en el intervalo entre 20 μm y 30 μm . En realizaciones preferidas, el tamaño de partícula de al menos 60%, al menos 70% y particularmente de al menos 80% o al menos 90% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 10\%$. Por ejemplo, si el diámetro medio de las partículas de cristal producidas es de 25 μm , entonces el porcentaje respectivo de las partículas de cristal presentes en una preparación dada tiene un diámetro en el intervalo entre 22.5 μm y 27.5 μm .

10 Preferiblemente, el contenido de agua del monohidrato cristalino producido está en el intervalo entre 2.8% y 3.3% (p/p) (véase anteriormente, así como los análisis termogravimétricos a modo de ejemplo de las figuras 2, 5 y 8).

En realizaciones particulares, el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina se caracteriza por una termoestabilidad particular de menos de 0.5% (p/p) de doxorubicinona (esto es, el producto de degradación de aglicona de epirrubicina) que se produce después de la incubación a 100°C durante mes de acuerdo con directrices de ICH (véase, *inter alia*, la directriz Q1A (R2) de la ICH), como se indica más adelante en la tabla 8-1.

15 En otras realizaciones particulares, el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina se caracteriza además por un patrón de difracción de rayos X en polvo particular, como se ejemplifica mediante los análisis mostrados en las figuras 3, 6 y 9, en donde el patrón de difracción comprende picos característicos con ángulos de difracción promedio (2θ) de 5.1°, 9.1°, 13.6°, 22.1°, 22.5°, y 24.0° (cada uno $\pm 0.2^\circ$).

20 En realizaciones específicas, el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina se caracteriza además por un diagrama de calorimetría diferencial de barrido (DSC) particular, como se ejemplifica mediante los análisis mostrados en las figuras 1, 4 y 7, que comprende una intensidad máxima en el intervalo de temperaturas de 195°C a 205°C con un pico medio (esto es, punto de fusión) entre 201°C y 204°C.

25 Por último, un aspecto adicional de la presente invención se refiere al monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina como se ha descrito anteriormente en este documento para uso en la prevención y tratamiento del cáncer. En particular, el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina se utiliza para el tratamiento del cáncer de mama.

La invención se describe adicionalmente mediante las figuras y los siguientes ejemplos, que tienen únicamente el propósito de ilustrar realizaciones específicas de esta invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

30 La calorimetría de barrido diferencial (DSC, para determinar el punto de fusión) se realizó mediante pesaje preciso de la muestra en crisoles de alúmina (70 μL , herméticamente cerrados con una tapa de alúmina) utilizando una balanza ultramicro calibrada. Medición: Procesador TC11-TA Mettler con módulo DSC 30 o Mettler DSC 25 con horno de plata y cristal de sensor cerámico y Controlador TC15A-TA Mettler (25°C a 250°C, 10°C/min). Gas de purga: N_2 , 80 mL/min, flujo de masa controlado. Calibración: Se realiza directamente antes de la medición de la muestra con indio (In) ultrapuro como material de referencia (escala de temperatura, escala de flujo de calor).

35 Se realizó la titulación coulométrica de Karl Fischer (KFT para determinar el contenido de agua) con un horno de secado externo (Metrohm 707 KF, operado a 140°C con purga de N_2). Las muestras se pesaron con precisión sobre una balanza analítica (10^{-5} g).

40 El análisis termogravimétrico (análisis TG, para determinar el contenido de agua) se realizó mediante pesaje preciso de la muestra en crisoles de alúmina (100 μL , sellados con una tapa de alúmina con un orificio perforado de 50 μm de láser) utilizando una balanza ultramicro calibrada. Medición: Mettler TGA/DSC1, horno grande; caja de control de gas (gas de purga: N_2 , 80 mL/min, flujo de masa controlado).

Los análisis por HPLC y GC se realizaron de acuerdo con protocolos estándar.

45 El análisis de difracción de rayos X en polvo se realizó utilizando un difractómetro de transmisión STOE-STADI P con la siguiente configuración: radiación $n\text{Cu-K}\alpha_1$ ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$), $U = 40 \text{ kV}$, $I = 35 \text{ mA}$, haz primario monocromador curvo (Ge (111)), detector de posición lineal sensible, hendiduras: 1 mm, $d = 8 \text{ mm}$, región angular: $2\theta = 3$ a 90° , anchura de paso $\Delta 2\theta = 0.02^\circ$, 25 s/ 0.2° paso. El polvo se llena originalmente entre dos láminas de mylar y luego en el soporte de muestra que tiene una máscara de $d = 8 \text{ mm}$.

Ejemplo 1

ES 2 623 218 T3

- (1) Se disolvieron 500.0 g de clorhidrato de epirrubicina amorfo (91.0% (p/p), según se determinó por análisis HPLC) en 10 L de agua. El agua se evaporó en un evaporador giratorio a baja presión a una temperatura de 40°C hasta que se alcanzó un estado de gel de la solución.
- 5 (2) Se adicionó 1-butanol en una cantidad de 10 L a la solución y se continuó la evaporación hasta que se formó un precipitado sólido.
- (3) Se adicionó etanol absoluto en la cantidad de 5 L a la solución de 1-butanol. La mezcla se calentó hasta que el precipitado sólido se volvió a disolver. El contenido de agua de la solución de 1-butanol/etanol se ajustó por evaporación a 8% a 10% (p/p) (según se determinó mediante titulación de Karl-Fisher). Posteriormente, se detuvo la evaporación y la solución se agitó a una temperatura de 75°C hasta que se formó un precipitado sólido.
- 10 (4) Los cristales de clorhidrato de epirrubicina se recogieron por filtración, se lavaron en 500 mL de acetona y se secaron al aire a una temperatura de 30°C a 35°C. Se obtuvieron 423 g de clorhidrato de epirrubicina cristalina (rendimiento global: 92.9%).

Caracterización funcional del compuesto obtenido:

- Punto de fusión (análisis DSC): 201.4°C (véase la figura 1)
- 15 Contenido en agua: 3.11% (p/p) (KFT)
3.22% (p/p) (análisis de TG, véase la figura 2)
Valor calculado para monohidrato: 3.01% (p/p)
- Contenido de HCl de epirrubicina (análisis HPLC): 96.4% (p/p)
- Contenido de solventes residuales (análisis GC): 0.26% (p/p)
- 20 Análisis de difracción de rayos X en polvo (véase la figura 3): picos característicos en ángulos de difracción (2θ) de 5.1°, 9.1°, 13.6°, 22.1°, 22.5°, y 24.0°

Los datos experimentales revelan que el compuesto obtenido es clorhidrato de epirrubicina (HPLC) que tiene una estructura cristalina específicamente definida (rayos X), siendo un contenido de agua indicativo de una forma monohidrato (KFT y TG) y que está desprovista de solventes residuales (GC).

25 Ejemplo 2

- (1) Se disolvieron 500.0 g de clorhidrato de epirrubicina amorfo (contenido: 91.0% (p/p), según se determinó por análisis de HPLC) en 10 L de agua. El agua se evaporó en un evaporador giratorio a baja presión a una temperatura de 40°C hasta que se alcanzó un estado de gel de la solución.
- 30 (2) Se adicionó 1-butanol en una cantidad de 10 L a la solución y se continuó la evaporación hasta que se formó un precipitado sólido.
- (3) Se adicionó 1-propanol en la cantidad de 5 L a la solución de 1-butanol. La mezcla se calentó hasta que el precipitado sólido se volvió a disolver. El contenido de agua de la solución de n-butanol/1-propanol se ajustó por evaporación hasta 9% a 10% (p/p) (según se determinó mediante titulación de Karl-Fisher). Posteriormente, se detuvo la evaporación y la solución se agitó a una temperatura de 78°C hasta que se formó un precipitado sólido.
- 35 (4) Los cristales de clorhidrato de epirrubicina se recogieron por filtración, se lavaron en 500 mL de acetona y se secaron al aire a una temperatura de 30°C a 35°C. Se obtuvieron 435 g de clorhidrato de epirrubicina cristalina (rendimiento global: 95.6%).

Caracterización funcional del compuesto obtenido:

- Punto de fusión (análisis DSC): 203.9°C (véase la figura 4)
- 40 Contenido en agua: 3.11% (p/p) (KFT)
3.17% (p/p) (análisis de TG, véase la figura 5)
Valor calculado para monohidrato: 3.01% (p/p)
- Contenido de HCl de epirrubicina (análisis HPLC): 96.1% (p/p)

Contenido en solvente (análisis GC): 0.23% (p/p)

Análisis de difracción de rayos X en polvo (véase la figura 6): picos característicos en ángulos de difracción (2θ) de 5.1°, 9.1°, 13.6°, 22.1°, 22.5°, y 24.0°

5 Los datos experimentales revelan que el compuesto obtenido es clorhidrato de epirrubicina (HPLC) que tiene una estructura cristalina específicamente definida (rayos X), siendo un contenido de agua que es indicativo de una forma monohidrato (KFT y TG) y que está desprovisto de solventes residuales (GC).

Ejemplo 3

10 (1) Se disolvieron 500.0 g de clorhidrato de epirrubicina amorfo (contenido: 91.0% (p/p), según se determinó por análisis de HPLC) en 10 L de agua. El agua se evaporó en un evaporador giratorio a baja presión a una temperatura de 40°C hasta que se alcanzó un estado de gel de la solución.

(2) Se adicionó 1-butanol en una cantidad de 10 L a la solución y se continuó la evaporación hasta que se formó un precipitado sólido.

15 (3) Se adicionó una mezcla de etanol y 1-propanol (1: 1 (v/v)) en la cantidad de 5 L a la solución de 1-butanol. La mezcla se calentó hasta que el precipitado sólido se volvió a disolver. El contenido de agua de la solución resultante se ajustó por evaporación hasta 8% a 10% (p/p) (según se determinó mediante titulación de Karl-Fisher). Posteriormente, se detuvo la evaporación y la solución se agitó a una temperatura de 75°C hasta que se formó un precipitado sólido.

(4) Los cristales de clorhidrato de epirrubicina se recogieron por filtración, se lavaron en 500 mL de acetona y se secaron al aire a una temperatura de 30°C a 35°C. Se obtuvieron 431 g de clorhidrato de epirrubicina cristalina (rendimiento total: 94.7%).

20 Caracterización funcional del compuesto obtenido:

Punto de fusión (análisis DSC): 201,6 °C (véase la figura 7)

Contenido en agua: 3.11% (p/p) (KFT)

3.16% (p/p) (análisis de TG, véase la figura 8)

Valor calculado para monohidrato: 3.01% (p/p)

25 Contenido de HCl de epirrubicina (análisis HPLC): 97.0% (p/p)

Contenido de solvente (análisis GC): 0.21% (p/p)

Análisis de difracción de rayos X en polvo (véase la figura 9): picos característicos en ángulos de difracción (2θ) de 5.1°, 9.1°, 13.6°, 22.1°, 22.5°, y 24.0°

30 Los datos experimentales revelan que el compuesto obtenido es clorhidrato de epirrubicina (HPLC) que tiene una estructura cristalina específicamente definida (rayos X), siendo un contenido de agua indicativo de una forma monohidrato (KFT y TG) y que está desprovisto de solventes residuales (GC).

Los datos funcionales obtenidos en los ejemplos 1-3 muestran un grado muy alto de consistencia que es indicativo de la producción del mismo compuesto.

Ejemplo 4 (Ejemplo comparativo)

35 (1) Se disolvieron 500.0 g de clorhidrato de epirrubicina cristalina en 5 L de agua. El agua se evaporó en un evaporador giratorio a baja presión a una temperatura de 40°C hasta que se alcanzó un estado de gel de la solución.

(2) La solución en gel de clorhidrato de epirrubicina se vertió en 9 L de acetona.

40 (3) Los cristales precipitados de clorhidrato de epirrubicina se recogieron por filtración, se lavaron en 500 mL de acetona y se secaron al aire a una temperatura de 30°C a 35°C. Se obtuvieron 512 g de cristales precipitados. El análisis por HPLC confirmó la presencia de clorhidrato de epirrubicina.

(4) Determinación del contenido de agua (valor calculado para el trihidrato: 9.03% (p/p))

Análisis: 9.81% (p/p) (KFT)

9.85% (p/p) (análisis de TG, véase la figura 10)

Los datos experimentales revelan que el clorhidrato de epirrubicina cristalino obtenido tiene un contenido de agua que es indicativo de una forma de trihidrato.

Ejemplo 5

- 5 El monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con el ejemplo 1 se expuso a una temperatura de 25°C, 40°C y 100°C, respectivamente, durante el período de tiempo (en meses) indicado. Los ensayos se realizaron tal como se describe en las directrices ICH (véase, *inter alia*, la directriz Q1A (R2) de ICH). La cantidad de producto de degradación (esto es, doxorubicinona) producida, así como la de clorhidrato de epirrubicina intacto (ambos en % (p/p)) se determinó por análisis HPCL ("LT" = menor que). Los resultados se resumen en la tabla 5-1.
- 10 Los resultados demuestran una excepcional alta estabilidad del monohidrato cristalino producido, no sólo con respecto a la vida útil global (estabilidad durante un periodo de tiempo de (al menos) 5 años a una temperatura de 25°C) sino también con respecto a la termoestabilidad (estabilidad durante un periodo de tiempo de (al menos) 6 meses a una temperatura de 40°C).

Tabla 5-1: Termoestabilidad de clorhidrato de epirubicina monohidrato

T [°C]	25		40		100	
t [mo]	Doxo-rubicinona	Ensayo	Doxo-rubicinona	Ensayo	Doxo-rubicinona	Ensayo
0	LT 0.05	99.2	LT 0.05	99.2	LT 0.05	99.2
1	LT 0.05	99.4	LT 0.05	99.2	LT 0.5**	98.3
3	LT 0.05	99.4	LT 0.05	99.1		
6	LT 0.05	99.2	LT 0.05*	99.3		
12	LT 0.05	99.0				
24	LT 0.05	99.4				
36	LT 0.05	99.1				
48	LT 0.05	99.1				
60	LT 0.05	99.2				

* El estudio se terminó en seis meses según las directrices de ICH

** El estudio se terminó en un mes sin observaciones críticas

- 15 Análisis adicionales utilizando el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con los ejemplos 2 y 3, respectivamente, revelaron resultados casi idénticos (no mostrados).

El mismo análisis se realizó con el trihidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con el ejemplo 4. Los resultados se resumen en la tabla 5-2.

Tabla 5-2: Termoestabilidad de clorhidrato de epirubicina trihidrato

T [°C]	25		40		100	
t [mo]	Doxo-rubicinona	Ensayo	Doxo-rubicinona	Ensayo	Doxo-rubicinona	Ensayo
0	LT 0.05	98.8	LT 0.05	98.8	LT 0.05	98.8

1	0.06	98.7	0.22	98.4	4.7**	89.5
3	0.09	98.7	0.45	98.2		
6	0.22	98.4	0.78*	98.0		
12	0.42	98.5				
24	0.62	98.0				

* El estudio se terminó en seis meses según las directrices de ICH

** El estudio se terminó en un mes sin observaciones críticas

5 Los datos muestran una degradación significativa de la forma de trihidrato incluso dentro de los seis meses de almacenamiento a una temperatura de 25°C. La acumulación de la doxorubicinona aglicona aumenta drásticamente con la temperatura elevada. Por consiguiente, las propiedades superiores del clorhidrato de epirubicina cristalina de la presente invención son una característica inherente de la forma de monohidrato obtenida.

Ejemplo 6

10 El monohidrato cristalino de clorhidrato de epirubicina preparado de acuerdo con el ejemplo 1 se expuso a una temperatura de 25°C o 40°C y una humedad relativa de 40-90%, respectivamente, durante el periodo de tiempo (en días) indicado. El ensayo se realizó como se describe en las directrices de ICH. Los contenidos de agua respectivos de las muestras (en% (p/p)) se midieron por medio de la titulación de Karl-Fischer y los resultados se resumen en la tabla 6-1.

Tabla 6-1: Capacidad higroscópica de clorhidrato de epirubicina monohidrato

		Contenido de agua, KF [% p/p]			
T [°C]		25		40	
rh [%]		40	60	75	90
t [d]					
0		3.1	3.1	3.1	3.1
3		3.2	3.3	3.2	3.3
7		3.1	3.3	3.3	3.5
15		3.0	3.2	3.5	3.6

15 Los datos experimentales muestran que el monohidrato cristalino del clorhidrato de epirubicina producido no presenta ninguna capacidad higroscópica significativa. Incluso cuando se expusieron al 90% de humedad relativa y 40°C durante 15 días, la absorción de agua fue sorprendentemente pequeña.

Análisis adicionales utilizando el monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con los Ejemplos 2 y 3, respectivamente, revelaron resultados casi idénticos (no mostrados). El mismo análisis se realizó con el trihidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con el ejemplo 4. Los resultados se resumen en la tabla 6-2.

Tabla 6-2: Capacidad higroscópica de clorhidrato de epirubicina trihidrato

Contenido de agua, KF [% p/p]					
T [°C]		25		40	
rh [%]		40	60	75	90
t [d]					
0		9.8	9.8	9.8	9.8
3		10.1	14.0	17.2	33.3
7		12.6	18.9	28.1	---
15		13.7	31.7	---	---

5

Los datos muestran una considerable extensión de la absorción de agua ya después de 3 días de exposición. Por consiguiente, de nuevo, las propiedades superiores del clorhidrato de epirrubicina cristalina de la presente invención son una característica inherente de la forma de monohidrato obtenida.

Ejemplo 7 (Ejemplo comparativo)

10 Se analizaron tres muestras de clorhidrato de epirrubicina cristalino siendo producidas de acuerdo con diferentes métodos con respecto a sus respectivas distribuciones de tamaño de partícula por medio de análisis de difracción láser.

La muestra 1 se preparó de acuerdo con el ejemplo 1 del Documento de Patente WO 2012/163508 A1.

15 En resumen, se suspendieron 9.0 g de clorhidrato de epirrubicina amorfo en una mezcla de 12 mL de agua, 258 mL de 2-propanol y 30 mL de 1-butanol. Esta suspensión se calentó a 65°C, mientras se agitaba y se dejó a esta temperatura durante cuatro horas. Después, la suspensión se enfrió gradualmente a una temperatura de 22°C. Después de la eliminación del solvente contenido en la suspensión por filtración, los cristales se lavaron con acetona y se secaron durante 24 horas bajo vacío después de la eliminación de acetona.

20 El análisis por difracción láser se realizó en forma de difracción láser húmeda en acetona: 1750 rpm, tiempo de ciclo de 3 x 20 s, tiempo de fondo de 60 s, sin sonicación y tiempo de agitación de 5 min utilizando un analizador de tamaño de partícula Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La figura 11 muestra los resultados de un análisis representativo, así como imágenes de microscopía dispersa en húmedo de ejemplo con aumento de 40 veces y 100 veces, respectivamente.

25 Los resultados demuestran una variación de los tamaños de partícula en el intervalo entre 1 µm y 80 µm con un pico a aproximadamente 5 µm y un segundo pico a aproximadamente 50 µm. El diámetro medio basado en el volumen de las partículas (también denominado como "D (v/0.5)") se puede calcular que es de 4.62 µm. La variación del tamaño de las partículas también es directamente visible bajo el microscopio. Además, las partículas no parecen ser cristalinas.

La muestra 2 se preparó de acuerdo con el ejemplo 2 del Documento de Patente WO 2012/163508 A1.

30 En resumen, se disolvieron 10.0 g de clorhidrato de epirrubicina amorfo en una mezcla de 13 mL de agua y 13 mL de 2-propanol, con el fin de preparar una solución que contenía clorhidrato de epirrubicina. Esta solución se mezcló después con 33 mL de 1-butanol y 274 mL de 2-propanol. La mezcla producida se calentó a 65°C y se dejó a esta temperatura durante cuatro horas, con lo que se formaron cristales de clorhidrato de epirrubicina. A continuación, la suspensión obtenida se enfrió gradualmente a una temperatura de 22°C. El solvente contenido en la suspensión se separó por filtración y los cristales que quedaron como residuo de filtro se lavaron con acetona. Después de retirar la acetona, los cristales se secaron durante 24 horas bajo vacío.

35 El análisis de difracción láser se realizó como se ha descrito anteriormente.

La figura 12 muestra los resultados de un análisis representativo, así como imágenes de ejemplo de microscopía dispersa en húmedo con aumentos de 40 y 100 veces, respectivamente.

5 Los resultados demuestran de nuevo una variación considerable de los tamaños de partícula en el intervalo entre 1 μm y 80 μm sin un pico máximo único prominente. El valor D (v/0.5) se puede calcular que es de 9.04 μm . La distribución de tamaños no uniforme de las partículas también es directamente visible bajo el microscopio. Además, las partículas tampoco parecen ser cristalinas.

La muestra 3 se preparó de acuerdo con la presente invención, como se describe en el ejemplo 3 anterior.

El análisis de difracción láser se realizó como se ha descrito anteriormente.

10 La figura 13 muestra los resultados de un análisis representativo, así como imágenes de ejemplo de microscopía dispersa en húmedo con aumento de 40 veces y 100 veces, respectivamente.

Los resultados ilustran claramente una distribución altamente uniforme de los tamaños de partícula con un pico máximo único al valor D (v/0.5). El valor D (v/0.5) se puede calcular que es de 25.25 μm . La gran mayoría de las partículas de cristal que están presentes en la preparación tiene un tamaño dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 10\%$. Bajo el microscopio, las partículas parecen ser realmente cristalinas.

15 Estos datos demuestran que el método de la presente invención proporciona la producción de un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina que tiene una distribución de tamaño de partícula altamente uniforme.

Ejemplo 8 (Ejemplo comparativo)

Se analizaron tres muestras de clorhidrato de epirrubicina cristalino, producidas según diferentes métodos con respecto a su termoestabilidad en condiciones de estrés (esto es, durante el almacenamiento a 100°C durante un mes).

20 La muestra S se preparó de acuerdo con la presente invención, como se describe en el ejemplo 3 anterior. La muestra M1 se preparó de acuerdo con el ejemplo 1 de WO 2012/163508 A1, como se describe en el ejemplo 7 anterior. Finalmente, se preparó la Muestra M2 de acuerdo con el ejemplo 2 de WO 2012/163508 A1, como se describe en el ejemplo 7 anterior.

25 Las muestras se expusieron a una temperatura de 100°C, durante el periodo de tiempo (en semanas) indicado. El ensayo se realizó tal como se describe en la directriz Q1A (R2) de la ICH (véase anteriormente). Se determinó la cantidad de producto de degradación (esto es, doxorubicinona), así como las de diversas impurezas (esto es, doxorubicina y cuatro impurezas diferentes de identidad aún desconocida, todas dadas en % (p/p), "n.d." = no determinado) por análisis HPCL ("LT" = menor que). Los resultados se resumen en la tabla 8-1.

30 De forma análoga a los datos de termoestabilidad dados anteriormente, los datos adicionales obtenidos en condiciones de estrés muestran una degradación menos pronunciada del clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con la presente invención ("S") en comparación con las muestras preparadas de acuerdo con el Documento de Patente WO 2012/163508 A1 ("M1" y "M2"). Es tentador especular que la estabilidad disminuida de las últimas muestras se puede asignar a la mayor superficie específica debido a una mayor accesibilidad molecular de materiales amorfos en comparación con estados cristalinos (véase también el ejemplo 7). Además, el clorhidrato de epirrubicina preparado de acuerdo con la presente invención ("S") tiene también una cantidad significativamente reducida de impurezas presentes en la muestra (datos mostrados en **negrita**), proporcionando de este modo evidencia adicional de las propiedades superiores del clorhidrato de epirrubicina de la presente invención, por ejemplo, con respecto a la seguridad del producto.

Tabla 8-1: Termoestabilidad del clorhidrato de epirubicina monohidrato

Tiempo (semanas)		Especificación según ICH																			
		Doxorrubicina (Aglicona) (NMT 1%)			Doxorrubicina (NMT 1%)			Impureza desconocida RRT 1.1 (NMT 0.15%)			Impureza desconocida RRT 1.2 (NMT 0.15%)			Impureza desconocida RRT 1.6 (NMT 0.15%)			Impureza desconocida RRT 1.7 (NMT 0.15%)			Impurezas totales (NMT 2%)	
S	M1	M2	S	M1	M2	S	M1	M2	S	M1	M2	S	M1	M2	S	M1	M2	S	M1	M2	
0	LT 0.05	LT 0.05	0.29	0.29	0.29	n/d	n/d	n/d	n/d	0.30	0.30	0.30									
1	0.39	0.52	0.54	0.28	0.27	0.27	---	---	0.06	0.12	0.12	---	0.08	0.12	0.08	0.12	0.12	0.12	0.14	0.14	1.30
2	0.40	0.57	0.59	0.32	0.32	0.32	---	0.11	0.13	0.12	0.12	0.07	0.18	0.21	0.05	0.18	0.21	0.09	0.16	0.18	1.70
3	0.46	0.61	0.61	0.32	0.33	0.32	---	0.14	0.14	0.13	0.13	0.08	0.24	0.27	0.12	0.24	0.27	0.13	0.20	0.22	1.80
4	0.49	0.61	0.60	0.33	0.33	0.33	0.06	0.18	0.18	0.16	0.16	0.11	0.46	0.39	0.15	0.46	0.39	0.15	0.31	0.26	2.1*

* Cantidad total de impurezas: 0.48 para S; 1.36 para M1; 1.1 para M2

Abreviaturas: RRT, tiempo de retención relativo; NMT, no más de

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina, que comprende:
- (a) adicionar al menos un primer solvente y al menos un segundo solvente al clorhidrato de epirrubicina, en donde
- 5 (i) el primer solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, y mezclas de los mismos;
- (ii) el segundo solvente se selecciona del grupo que consiste en 1-propanol, isopropanol, etanol, y mezclas de los mismos; y
- (iii) la relación de volumen del primer solvente al segundo solvente está en el intervalo entre 1:1 y 2:1 (v/v);
- 10 (b) ajustar en la solución obtenida en la etapa (a) el contenido de agua a una cantidad en el intervalo entre 8% y 11% (p/p); y
- (c) calentar la solución obtenida en la etapa (b) a una temperatura de 70°C a 90°C con el fin de permitir la cristalización; en donde el monohidrato cristalino producido tiene un contenido de agua en el intervalo entre 2.7% y 3.5% (p/p) y está desprovisto de solventes residuales.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el primer solvente es 1-butanol y el segundo solvente es 1-propanol.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende, además: calentar la mezcla de la etapa (a) a una temperatura de 40°C a 55°C hasta que se completa la disolución completa de la mezcla de reacción.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración final de clorhidrato de epirrubicina en la solución de la etapa (b) está en el intervalo entre 10 g/L y 100 g/L.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la solución en la etapa (c) se calienta a una temperatura de 75°C a 85°C.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende, además: siembra de la solución obtenida en la etapa (b) con el fin de inducir la cristalización.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además: purificar los cristales obtenidos en la etapa (c).
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el contenido de agua del monohidrato cristalino del clorhidrato de epirrubicina está en el intervalo entre 2.8% y 3.3% (p/p).
9. Monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina, producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde
- (i) el diámetro medio de las partículas de cristal producidas está en el intervalo entre 20 μm y 50 μm ; y
- 30 (ii) el tamaño de partícula de al menos 60%, y particularmente de al menos 80% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 20\%$.
10. El monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina de la reivindicación 9, en donde el tamaño de partícula de al menos 60%, y particularmente de al menos 80% de las partículas de cristal producidas está dentro del intervalo dado por el diámetro medio $\pm 10\%$.
- 35 11. El monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina de la reivindicación 9 o 10, caracterizado además por una termoestabilidad que da como resultado la producción de menos de 0.5% (p/p) de doxorubicinona después de la incubación a 100°C, durante un mes de acuerdo con las directrices de ICH.
12. El monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado además por un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos con ángulos de difracción promedio (2θ) de 5.1°, 9.1°, 13.6°, 22.1°, 22.5°, y 24.0° (cada uno $\pm 0.2^\circ$).
- 40 13. El monohidrato cristalino de clorhidrato de epirrubicina de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para uso en la prevención y tratamiento del cáncer.

Fig.1

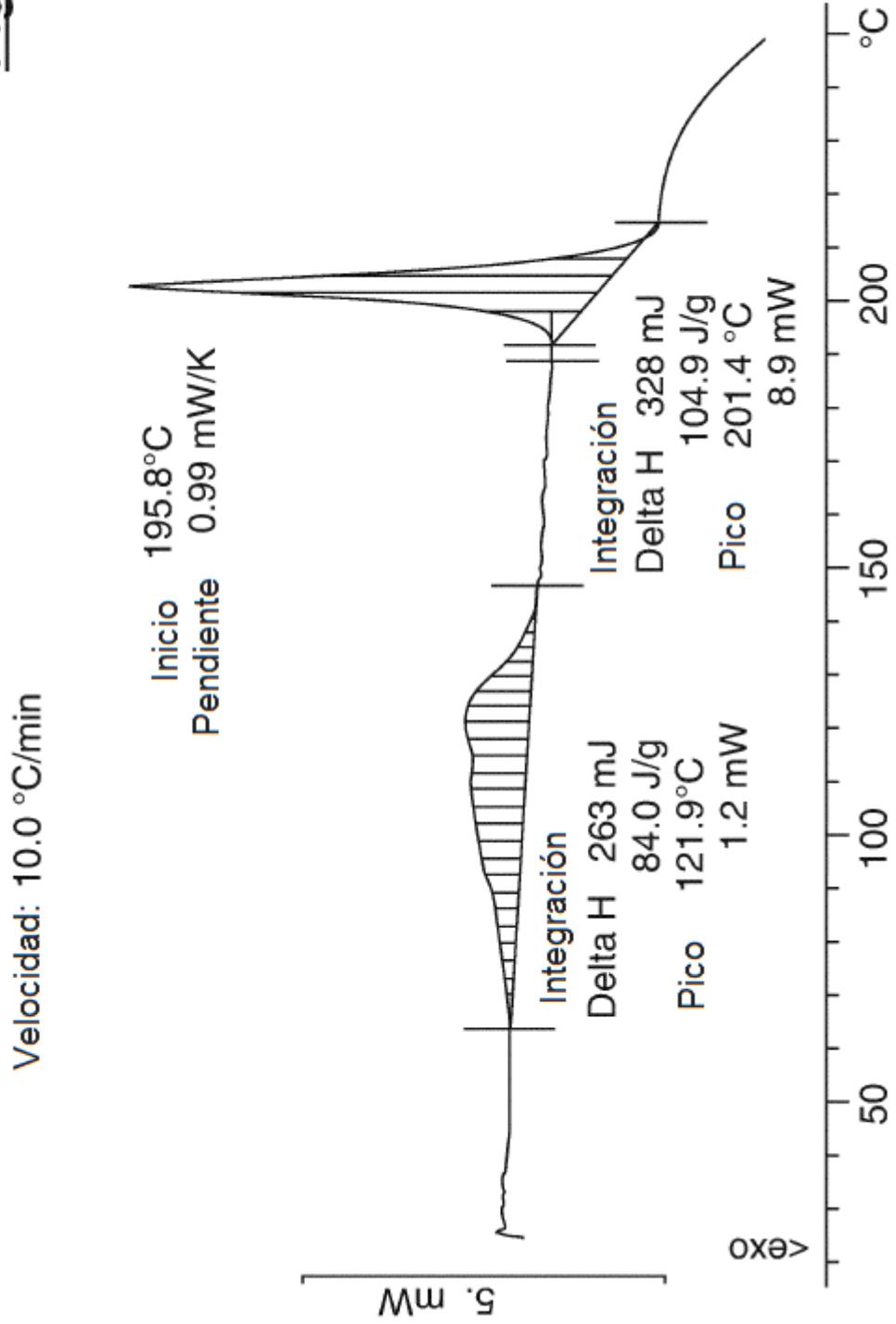


Fig. 2

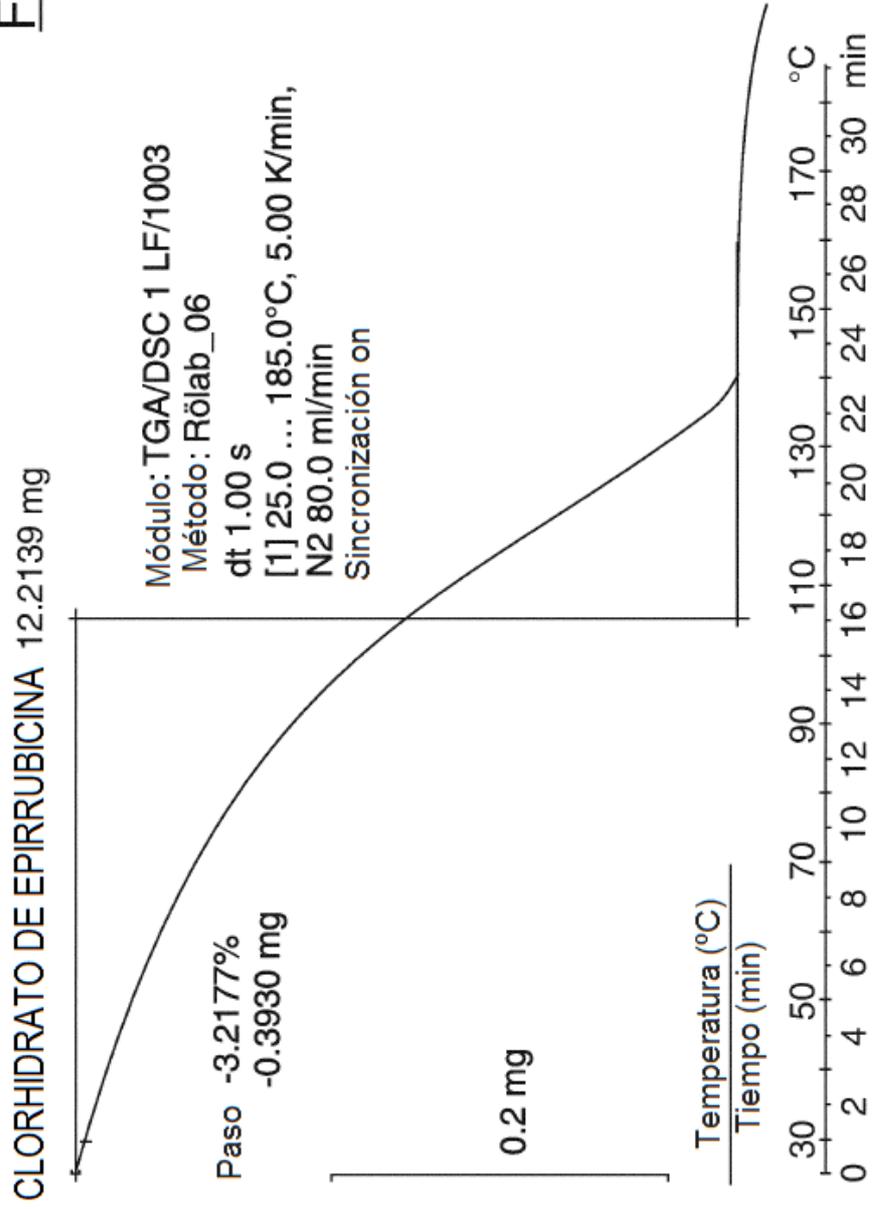


Fig. 3

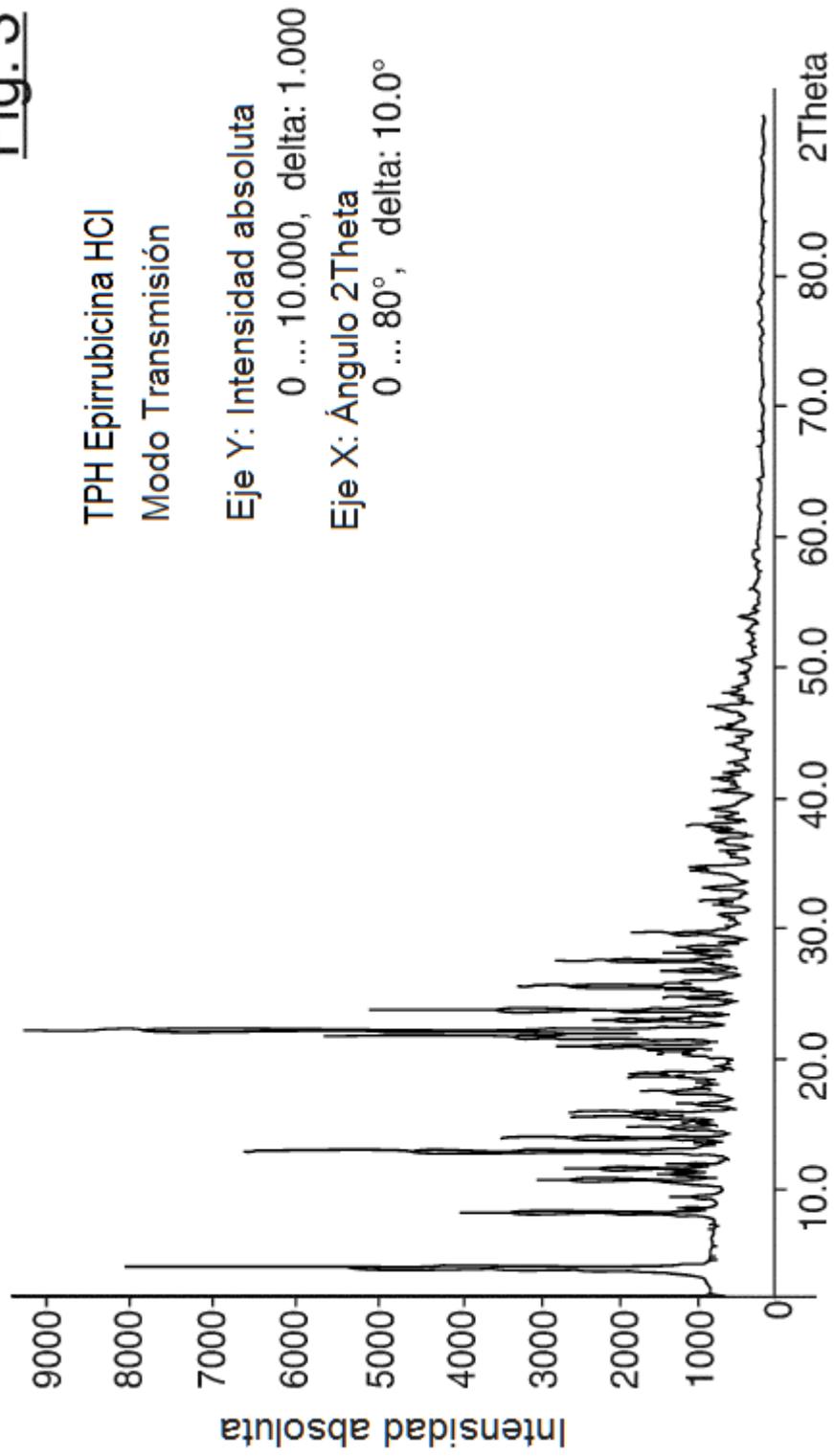


Fig. 4

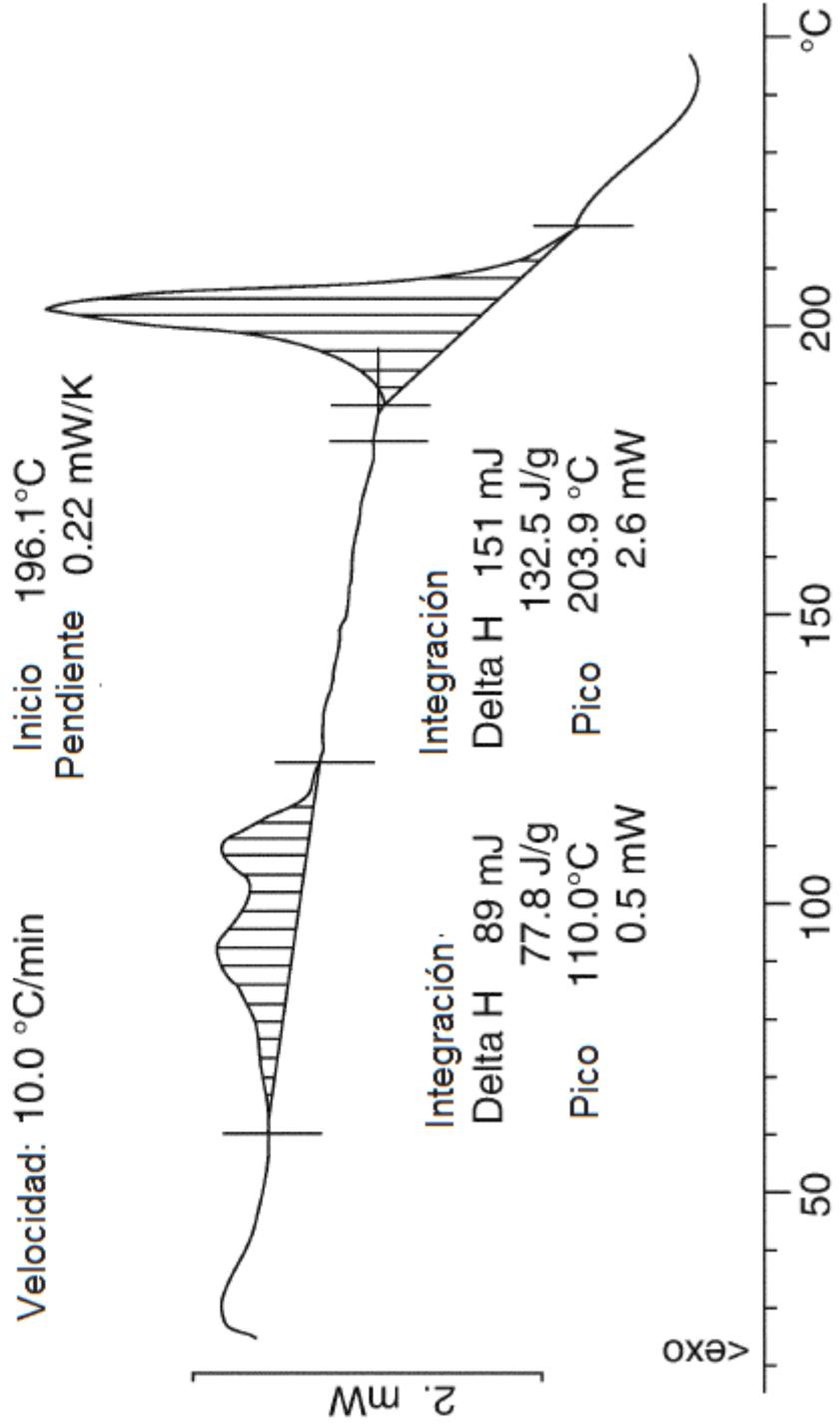


Fig. 5

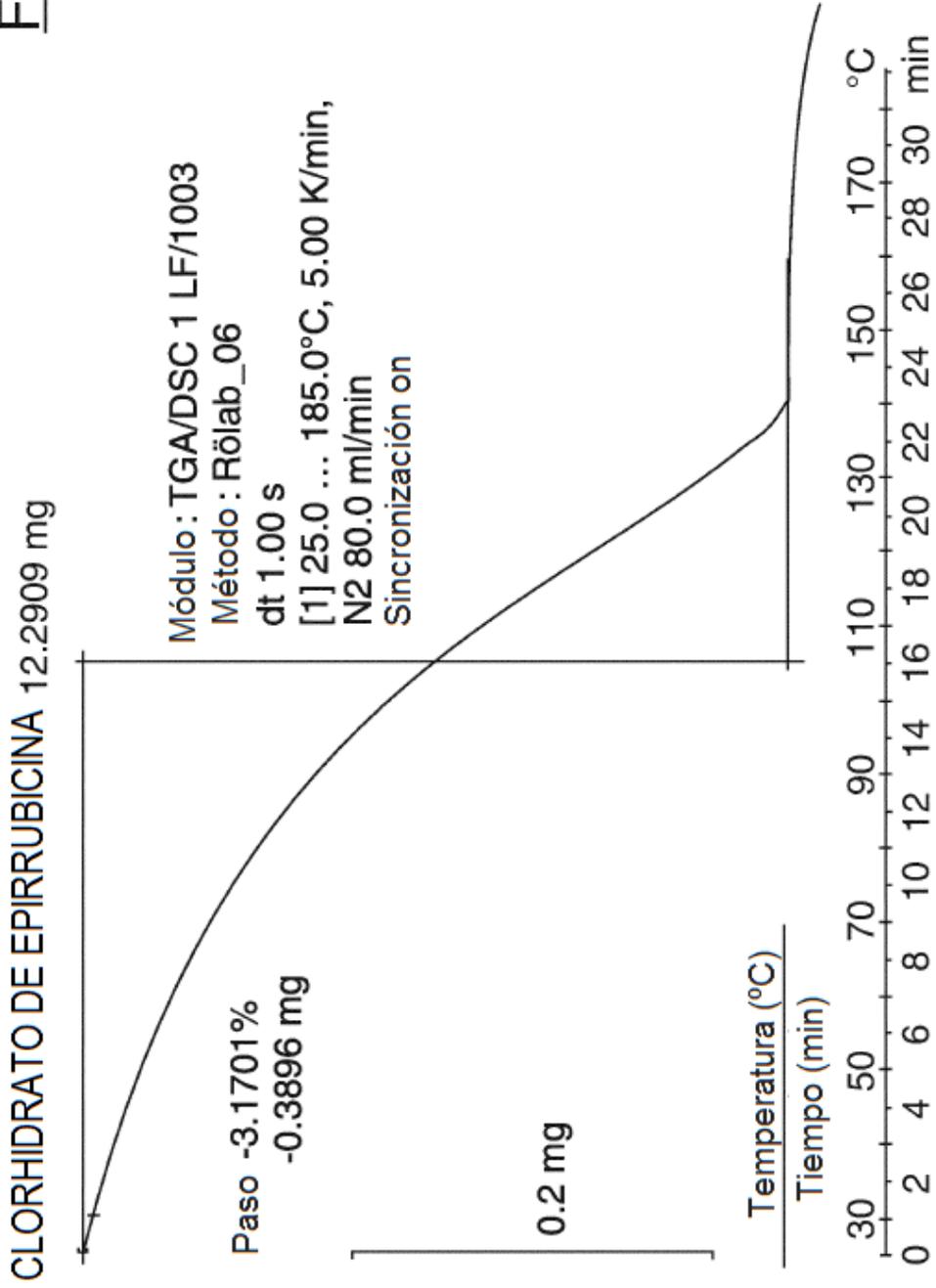


Fig. 6

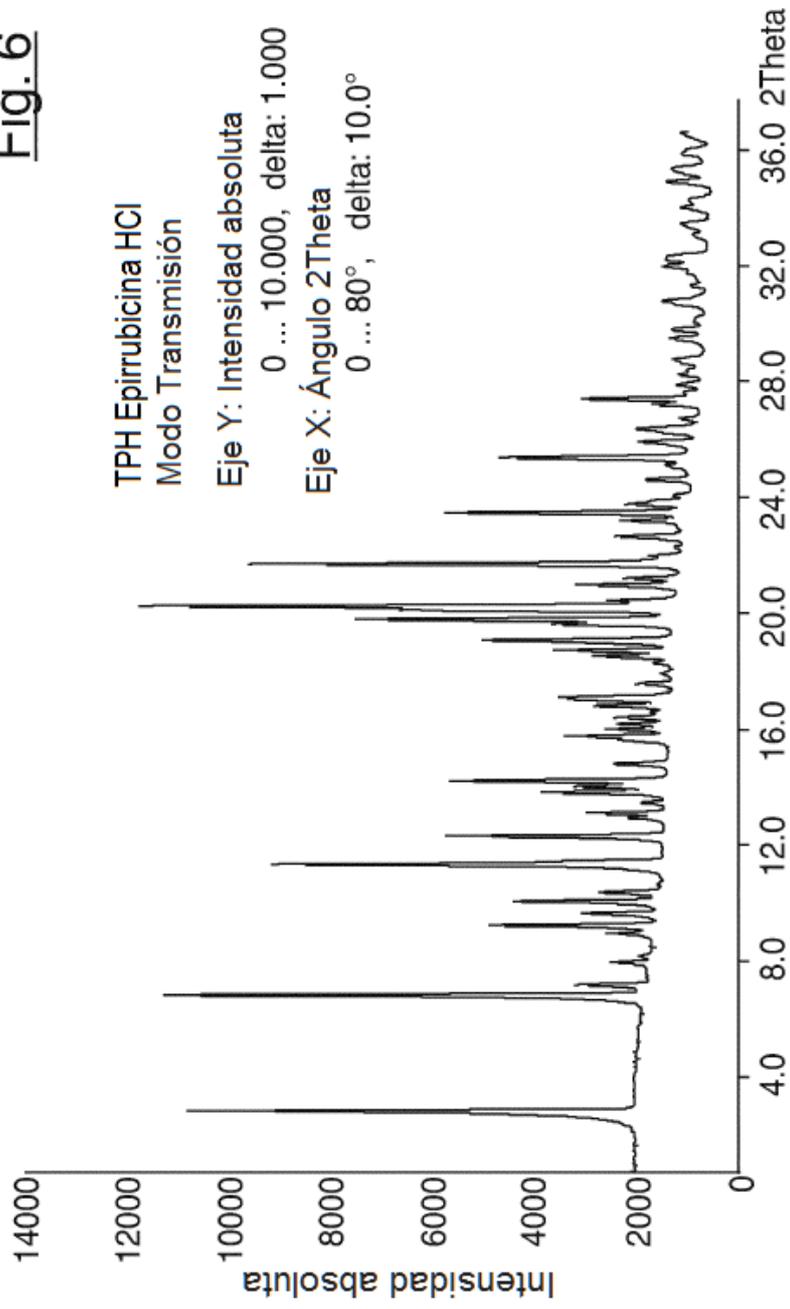


Fig. 7

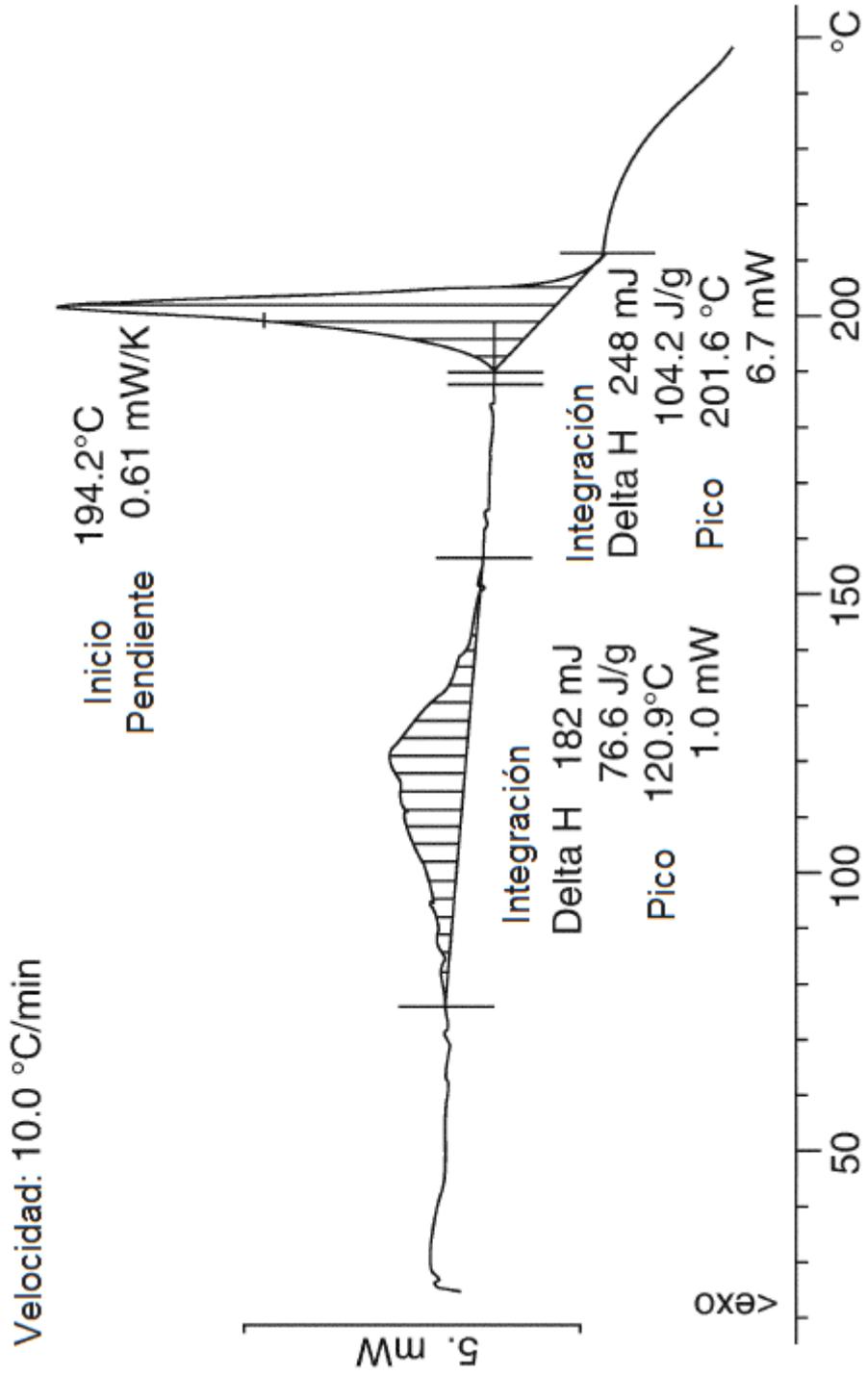


Fig. 8

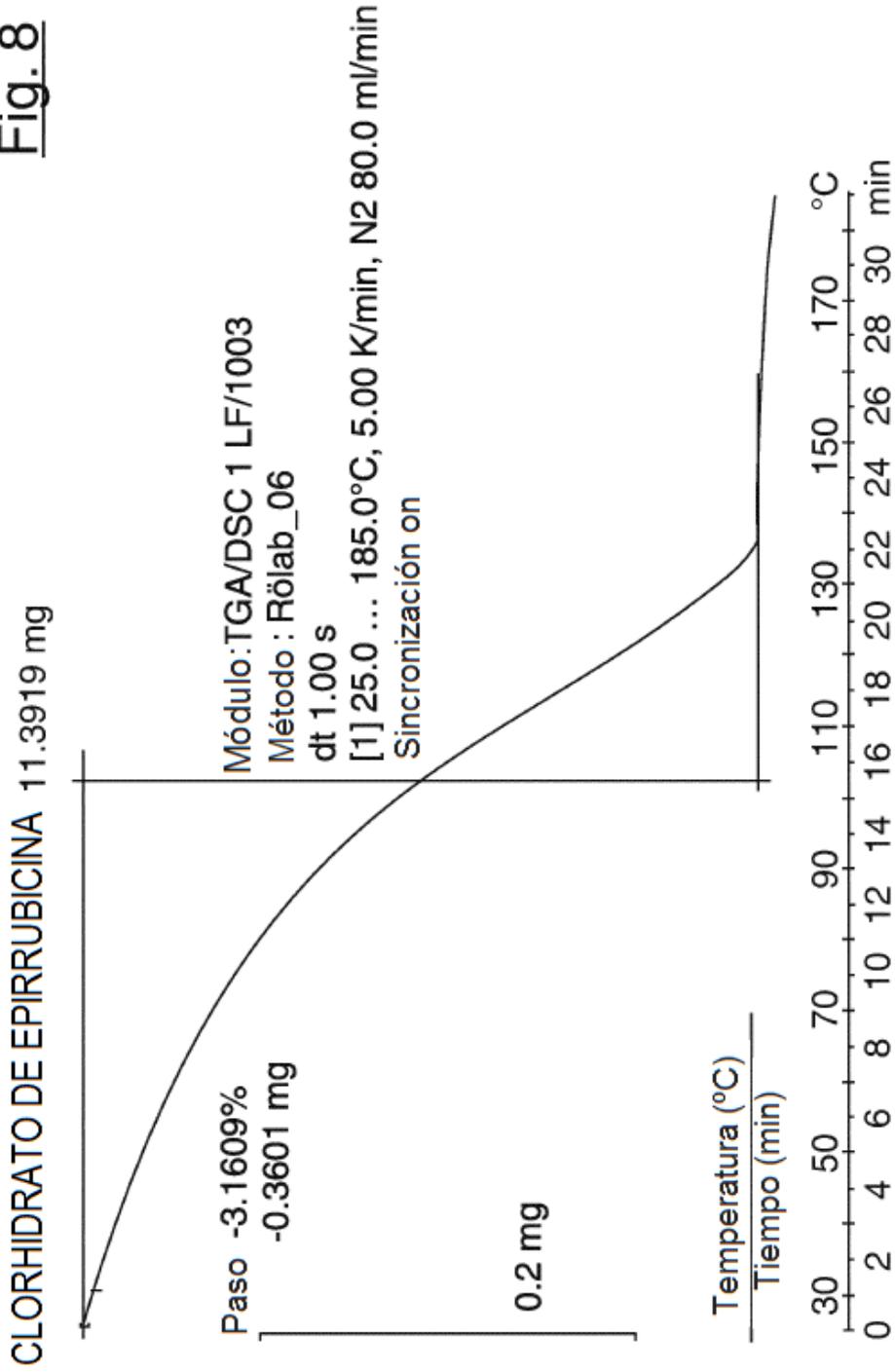


Fig. 9

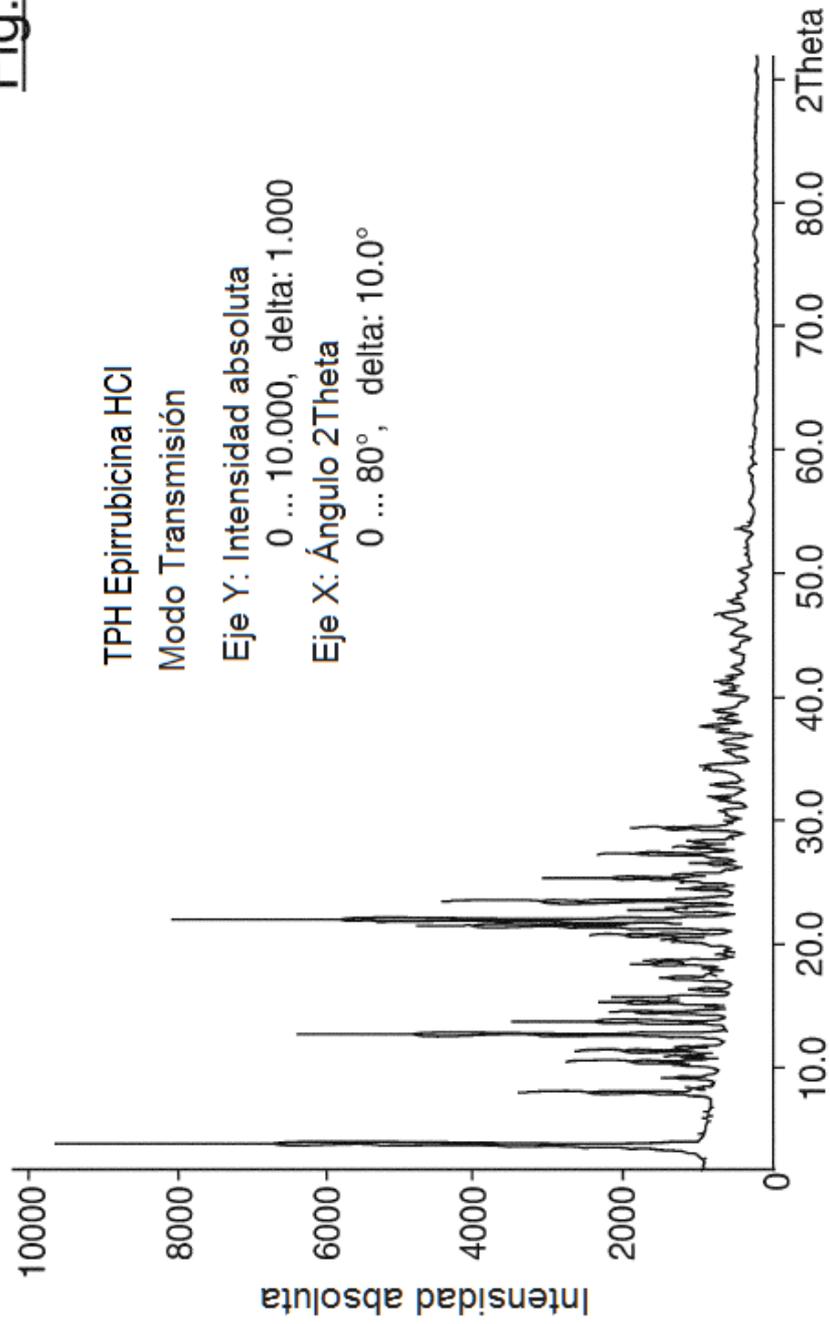


Fig. 10

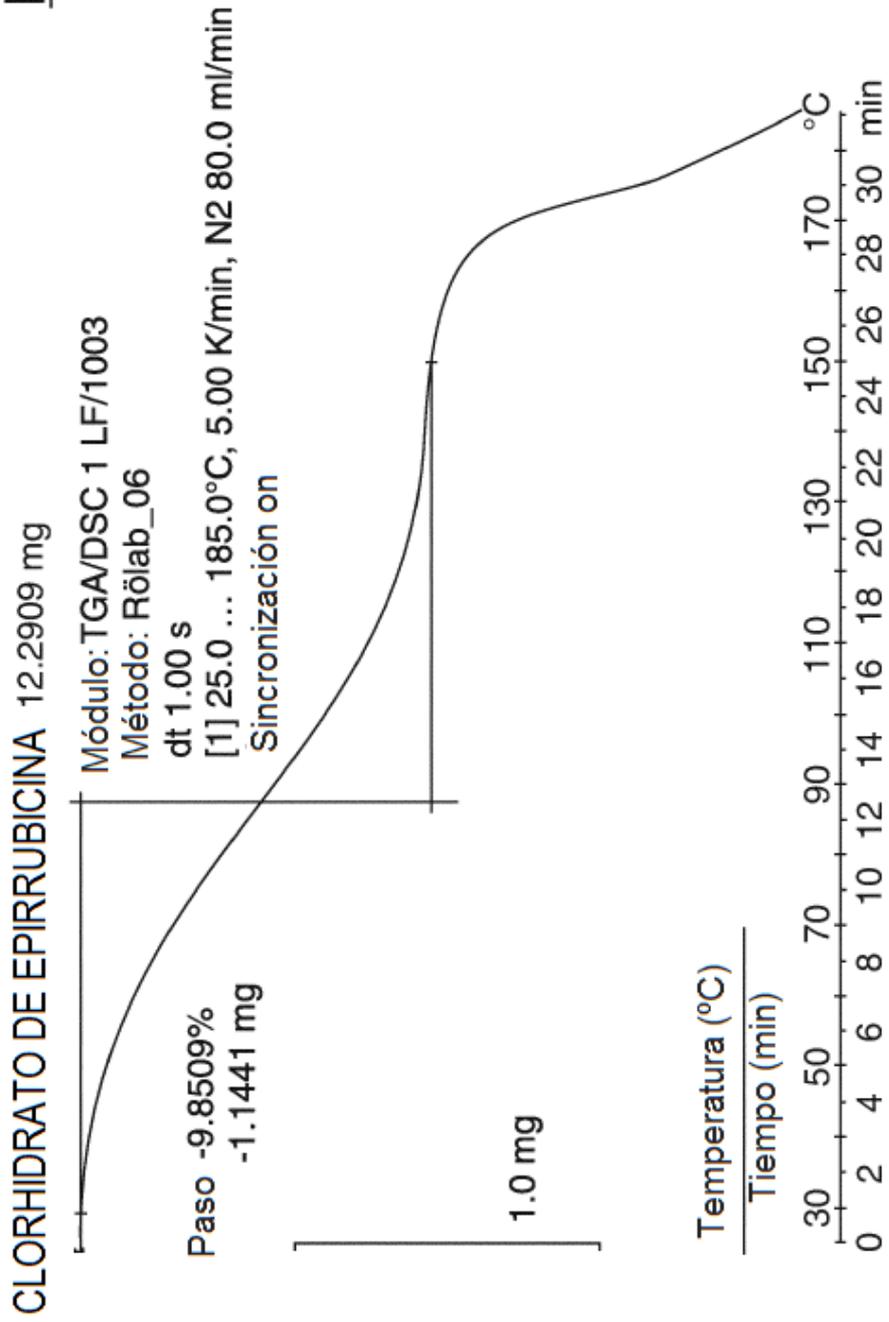
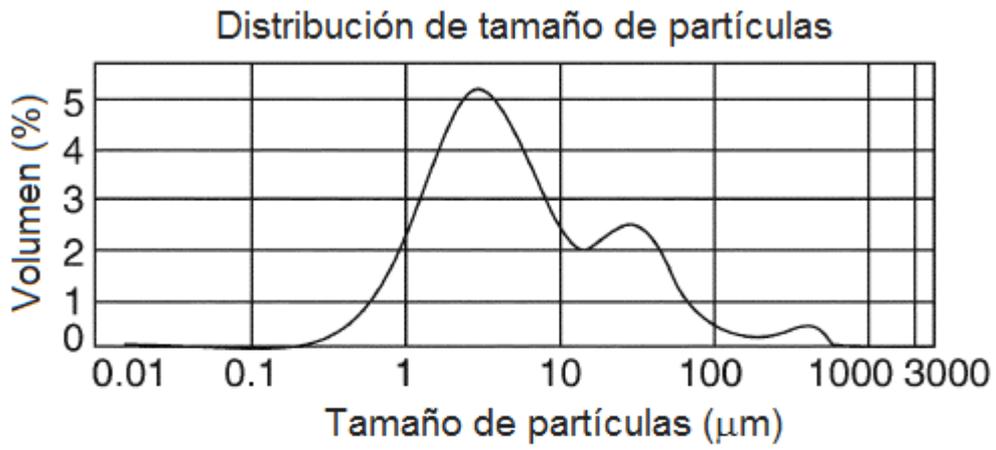
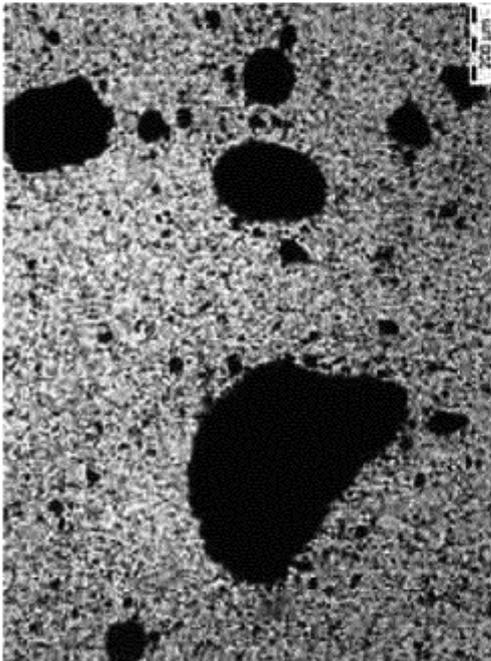


Fig. 11

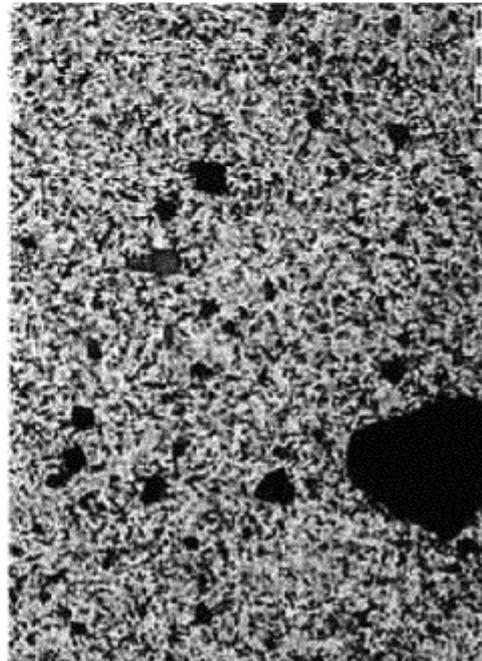
A



B

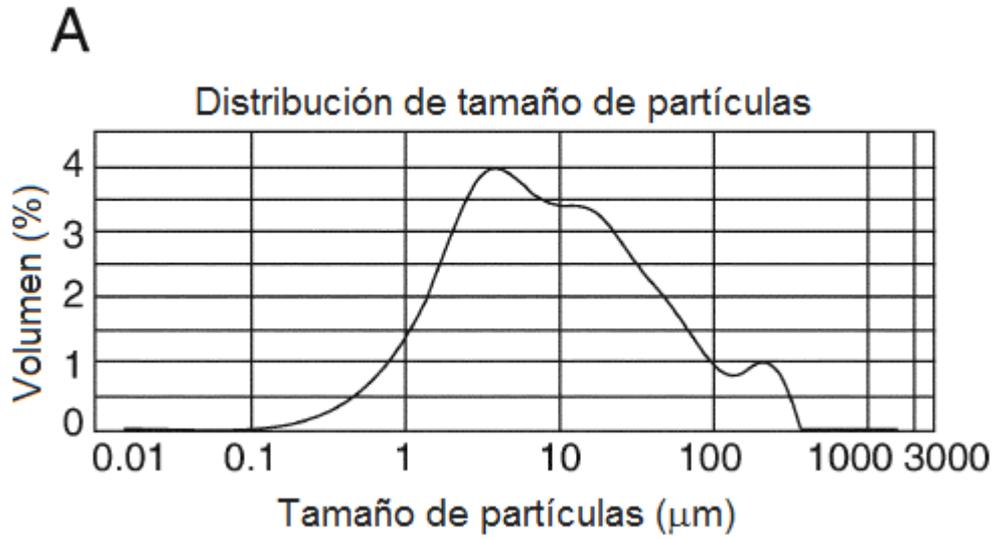


Aumento 40 veces

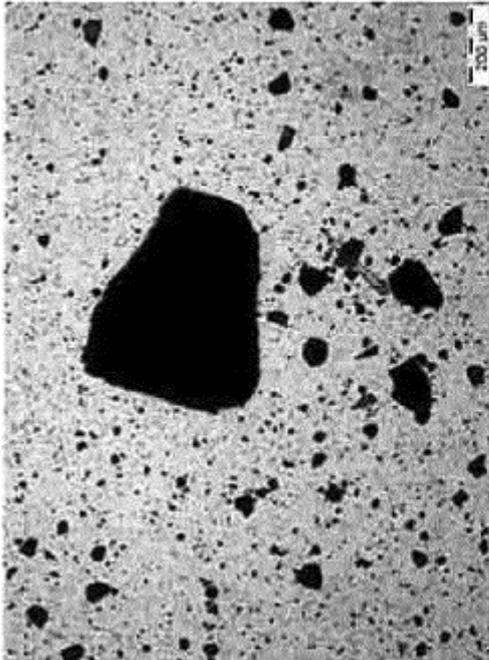


Aumento 100 veces

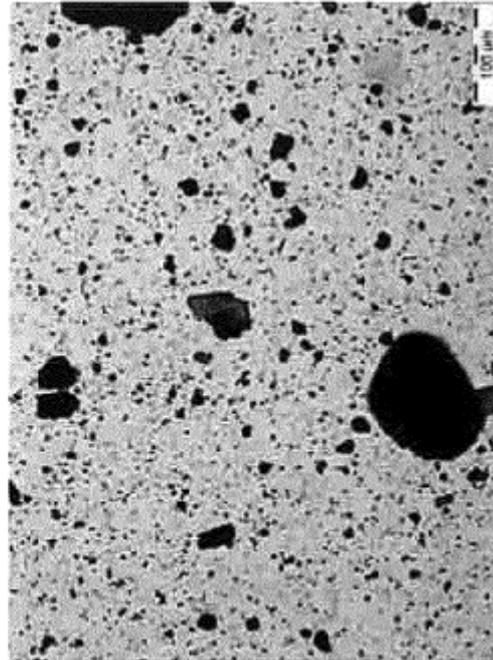
Fig. 12



B

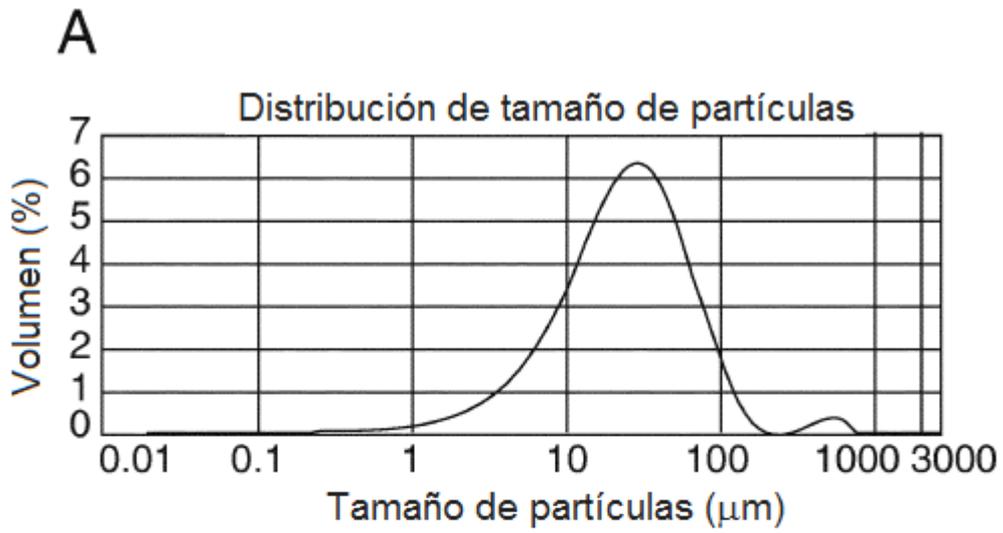


Aumento 40 veces

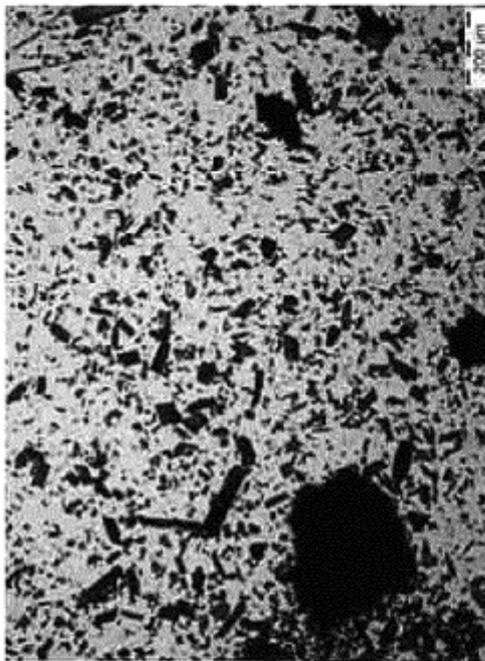


Aumento 100 veces

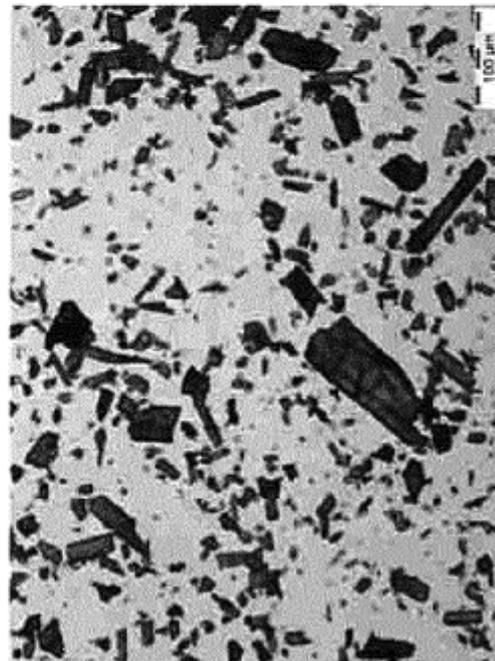
Fig. 13



B



Aumento 40 veces



Aumento 100 veces